

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**EAP. DE CIENCIAS BIOLOGICAS**

**Validación de un método de ensayo cuali-cuantitativo  
para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel  
intralaboratorial**

**TESIS**

para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Microbiología y  
Parasitología

**AUTOR**

Gaby Beatriz Sueros Rios

**ASESORES**

Susana Gutiérrez Moreno

Gelver Rivas Blas

**Lima – Perú**

**2013**

Dedico esta trabajo a mi padre Freddy cuyos consejos  
fueron mi impulso, a mi hermana Patricia  
por su apoyo incondicional, a mi madre Beatriz  
por su ejemplo y protección desde el cielo, a mi  
compañero inseparable Randy por su dedicación y  
apoyo y a Camilita un angelito que vino a iluminar mis  
días y mis noches.

## **AGRADECIMIENTOS**

Deseo manifestar mi profundo agradecimiento a mi asesora la profesora Susana Gutierrez Moreno, por haberme brindado su apoyo y sus consejos durante la elaboración de esta tesis.

Agradezco también al doctor Gerver Rivas Blas, por su orientación, consejos y asesoría durante la elaboración de la tesis.

AL Instituto Quimioterapico S.A. y a la Dra Juana Huayhua Escurra quienes me brindaron todo el apoyo y las herramientas necesarias para la realización de la tesis.

A Augusto Ortiz y Karina Moreno quienes me ayudaron en la elaboración de la parte experimental y permitieron que este proyecto se lleve a cabo.

A mis compañeros y amigos que me brindaron su amistad y ánimos durante el desarrollo de la tesis y a lo largo de esta etapa.

Muchas Gracias

# CONTENIDO

RESUMEN .....	9
INTRODUCCIÓN .....	13
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	15
HIPOTESIS .....	15
OBJETIVOS .....	15
MARCO TEÓRICO.....	16
Industria farmacéutica, medicamentos y control de calidad.....	16
Validación .....	17
Parámetros estadísticos para validar .....	18
Parámetros cuantitativos para recuento microbiano .....	19
Parámetros cualitativos Ausencia-Presencia .....	23
Teofilina .....	24
MATERIAL Y MÉTODOS .....	28
MATERIAL .....	28
MATERIAL BIOLÓGICO.....	28
PRODUCTO FARMACÉUTICO LÍQUIDO NO ESTÉRIL .....	29
MATERIAL DE LABORATORIO. ....	29
MÉTODOS.....	31
TIPO DE ESTUDIO.....	31
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	31
Preparación de cepas de prueba.....	31
Determinación de la calidad de los medios de cultivo.....	33
Preparación del placebo (medio de cultivo + producto).....	37
PARÁMETROS ESTADÍSTICOS .....	37
Parámetros cuantitativos para recuento microbiano .....	37
Especificidad .....	38
Límite de detección .....	39
Límite de cuantificación .....	39
Estudio de tolerancia.....	39
Estudio de Repetibilidad y Reproducibilidad (Precisión y Exactitud).....	40

Robustez .....	40
Linealidad .....	41
Parámetros cualitativos Ausencia –Presencia .....	41
Robustez .....	41
Tolerancia .....	42
Límite de detección .....	43
Especificidad .....	44
RESULTADOS .....	44
PREPARACIÓN DE CEPAS DE PRUEBA .....	45
CONTROL POSITIVO DE LOS MEDIOS .....	46
PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO PARA MEDIOS .....	47
PARÁMETROS CUANTITATIVOS PARA RECuento MICROBIANO .....	52
LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN .....	58
Repetibilidad .....	59
Reproducibilidad .....	60
Robustez .....	61
Tolerancia .....	62
Linealidad .....	64
PRUEBAS CUALITATIVAS AUSENCIA –PRESENCIA .....	69
Robustez .....	69
Tolerancia .....	71
Límite de detección .....	71
Especificidad .....	73
DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	75
CONCLUSIONES .....	78
RECOMENDACIONES .....	79
BIBLIOGRAFÍA .....	80

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> Parámetros de validación por tipo de prueba microbiológica.....	19
<b>Tabla II.</b> Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45
<b>Tabla III.</b> Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba <i>Bacillus subtilis</i> .....	45
<b>Tabla IV.</b> Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	45
<b>Tabla V.</b> Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba <i>Candida albicans</i> .....	45
<b>Tabla VI.</b> Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba <i>Aspergillus niger</i> .....	46
<b>Tabla VII.</b> Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba <i>Escherichia coli</i> .....	46
<b>Tabla VIII.</b> Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba <i>Salmonella entérica</i> .....	46
<b>Tabla IX.</b> Control positivo del medio Caldo Tripticasa de Soya .....	46
<b>Tabla X.</b> Control positivo del medio Agar Tripticasa de Soya .....	47
<b>Tabla XI.</b> Control positivo del medio Agar Sabouraud Glucosado .....	47
<b>Tabla XII.</b> Promoción de crecimiento para el Agar Tripticasa de Soya .....	48
<b>Tabla XIII.</b> Promoción de crecimiento para el medio Agar Sabouraud Glucosado .....	48
<b>Tabla XIV.</b> Promoción de crecimiento para el medio Caldo Tripticasa de Soya.....	50
<b>Tabla XV.</b> Promoción de crecimiento para el medio Caldo Mac Conkey .....	50
<b>Tabla XVI.</b> Promoción de crecimiento para el medio Agar Mac Conkey .....	51
<b>Tabla XVII.</b> Promoción de crecimiento para el medio Caldo Rappaport Vassiliadis.....	51
<b>Tabla XVIII.</b> Promoción de crecimiento para el medio Agar XLD .....	52
<b>Tabla XIX.</b> Lecturas obtenidas en los diluyentes A y B .....	53
<b>Tabla XX.</b> Recuento obtenido del producto + diluyente, diluyente, producto + diluyente + Neutralizante .....	56
<b>Tabla XXI.</b> Recuento mínimo obtenido de las cinco cepas de prueba enfrentadas con producto.....	58
<b>Tabla XXII.</b> Recuento mínimo obtenido de las cinco cepas de prueba enfrentadas sin producto.....	59
<b>Tabla XXIII.</b> Porcentaje de recuperación de las cepas de prueba.....	59
<b>Tabla XXIV.</b> Lecturas de los analistas A, B, C y sus respectivos DSR.....	60
<b>Tabla XXV.</b> Lecturas entre los analistas A, B, C y su respectivo DSR total .....	61
<b>Tabla XXVI.</b> Recuento de placas y porcentaje de cambio parcial en tres diferentes tiempos ..	62
<b>Tabla XXVII.</b> Resultado de porcentaje de cambio parcial y total en tres diferentes tiempos. .	62
<b>Tabla XXVIII.</b> Recuento obtenido en tres lotes del Caldo Tripticasa de Soya más producto (Tyrex 27 mg/5 ml jarabe). .....	63
<b>Tabla XXIX.</b> Recuento obtenido en tres lotes del Agar Tripticasa de Soya + producto (Tyrex 27 mg/5 ml jarabe) .....	63
<b>Tabla XXX.</b> Recuento obtenido en tres lotes del Agar Sabouraud Glucosado más producto (Tyrex 27 mg/5 ml jarabe) .....	63
<b>Tabla XXXI.</b> Recuento obtenido de las cinco cepas de prueba en cinco diluciones distintas con producto.....	65
<b>Tabla XXXII.</b> Recuento obtenido de las cinco cepas de prueba en cinco diluciones distintas sin producto. ....	67

<b>Tabla XXXIII.</b> Coeficiente de correlación ( $r^2$ ) obtenido en las cinco diluciones de prueba con o sin producto.....	69
<b>Tabla XXXIV.</b> Resultados obtenidos durante tres diferentes tiempos de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> .....	70
<b>Tabla XXXV.</b> Resultados obtenidos durante tres diferentes tiempos de crecimientos de <i>Salmonella enterica</i> .....	70
<b>Tabla XXXVI.</b> Resultados obtenidos del crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en tres lotes de medios distintos .....	71
<b>Tabla XXXVII.</b> Resultados obtenidos del crecimiento de <i>Salmonella enterica</i> en dos lotes de medios distintos.....	71
<b>Tabla XXXVIII.</b> Resultados obtenidos en la prueba de límite de detección para <i>Escherichia coli</i> .....	72
<b>Tabla XXXIX.</b> Resultados obtenidos en la prueba de límite de detección para <i>Salmonella enterica</i> .....	73
<b>Tabla XL.</b> <i>Resultados de especificidad obtenidos en la detección de Escherichia coli en medios selectivos</i> .....	74
<b>Tabla XLI.</b> <i>Resultados de especificidad obtenidos en la detección de Salmonella enterica en medios selectivos</i> .....	74

## RESUMEN

El presente trabajo consistió en validar un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial, basado en la técnica propuesta por la United States Pharmacopeia versión XXXIV (USP34).

La validación del método utilizando las distintas condiciones de trabajo es necesaria y exigida para comprobar que el método a emplear es el correcto, brindando resultados confiables y seguros.

Para la ejecución del presente trabajo se usó un producto farmacéutico líquido Tyrex jarabe (Teofilina 27 mg/5 mL jarabe) el cual se utiliza para prevenir y tratar el resoplo, el asma, la bronquitis, el enfisema y las enfermedades de otro tipo que afectan al pulmón.

Asimismo se trabajó con cepas estándares sugeridas por la USP34 como: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404; y para los ensayos cualitativos se usó: *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Antes de iniciar el presente trabajo se evaluaron los medios a usar realizando su respectivo control positivo y promoción de crecimiento, luego se procedió a comprobar los distintos parámetros estadísticos especificados en la USP 34; entre ellos tenemos para el ensayo cuantitativo: Exactitud, Precisión, Especificidad, Límite de detección, Límite de cuantificación, Linealidad, Robustez y Tolerancia; y para el ensayo cualitativo evaluamos: Robustez, Tolerancia, Límite de detección y Especificidad.

El método demostró que tiene la capacidad de detectar los microorganismos de prueba en presencia del diluyente, neutralizantes y producto con un porcentaje de recuperación mayor al 70 %.

Se comprobó que el método detecta y cuantifica 5 ufc/mL como la mínima cantidad de microorganismos que pueden ser detectables y cuantificables, además que es tolerante a los



cambios de lotes de los medios de cultivo obteniéndose como máximo 15% de coeficiente de variación. El método se caracteriza por ser exacto y preciso obteniéndose una desviación estándar relativa menor a 0.02 en resultados de pruebas individuales de cada analista tanto como entre ellos.

Asimismo, el método presenta robustez, obteniéndose un porcentaje de cambio menor al 15% de variación en el recuento obtenido en tres tiempos distintos de incubación.

Además, este método presenta una correlación de crecimiento proporcional a las concentraciones establecidas en el parámetro de linealidad obteniéndose un coeficiente de correlación mayor de 0.95 en todas las cepas de prueba.

Por otro lado, el método detecta cantidades mínimas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella entérica* ATCC 14028, demostrando ser específico utilizando medios selectivos para promover el crecimiento de dichos microorganismos, presentando robustez ya que el método no es afectado por pequeñas variaciones de tiempo y es tolerante al resistir cambios tales como la diferencias de lotes de un mismo medio.

En conclusión, el método demuestra ser seguro y confiable en las condiciones propuestas en este trabajo, para la detección y cuantificación de microorganismos que puedan estar presentes en el producto farmacéutico Tyrex jarabe.

## SUMMARY

This study was to validate a test method for qualitative and quantitative microbiological analysis of the Tyrex syrup at intralaboratorial level, based on the technique proposed by the United States Pharmacopeia version XXXIV (USP34).

Method validation using different working conditions is necessary and required to verify that the method to be used is correct and can provide safe and reliable results.

For the implementation of this study, we used a pharmaceutical liquid Tyrex syrup (Theophylline 27 mg / 5 mL syrup) which is used to prevent and treat various diseases such as wheezing, asthma, bronchitis, emphysema and other diseases which affect the lung.

Also, as suggested by the USP32 we worked with standard strains such as: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404, and for the qualitative tests we used: *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Salmonella enterica* ATCC 14028

Before starting this study, the media to be used were evaluated making their respective positive control and growth promotion. Then we proceeded to check the various statistical parameters specified in USP 34. Among them we have for the quantitative test: Accuracy, Precision, Specificity, Limit of detection, Limit of quantification, Linearity, Strength and Tolerance, and to evaluate the qualitative test: Strength, Grace, Detection Limit and Specificity.

The method has showed the ability to detect the test microorganisms in the presence of a diluent, and neutralizers and products with a recovery percentage greater than 70%.

It has been proved that the method detects and quantifies 5 ufc / mL as the minimum quantity of microorganisms that may be detectable and measurable. Also, it is tolerant of batch changes of growing means obtained at most 15% variation coefficient. The method is

characterized by being accurate and precise obtaining a relative standard deviation less than 0.02 in individual test results for each analyst as much as between them.

Furthermore, this method showed the presence of strength obtaining a percentage change less than 15% variation in the count obtained in three different incubation periods.

Besides, this method presents a correlation of growth proportional to the concentrations set in the linearity parameter obtaining a correlation coefficient greater than 0.95 in all strains tested.

On the other hand, the method proved to detect minimum amounts of the *Escherichia coli* ATCC 8739 organism, demonstrating to be specific using selective means to promote the growth of the organism, showing strength by not being affected by short time variations, and being tolerant by resisting changes such as batch differences of culture media.

In conclusion, the method proves to be safe and reliable for detection and quantification of microorganisms that may be present in the pharmaceutical Tyrex syrup, under the conditions proposed in this research.

# INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica es, a nivel mundial, una de las industrias que se encuentran en constante desarrollo y que se rige por normas nacionales e internacionales en actividades de manufactura y de control de procesos. Según la Ley N° 26842 Cap. III Art. 50 de la Ley General de Salud sólo se podrá inscribir o reinscribir en el Registro Sanitario de medicamentos las fórmulas farmacéuticas señaladas en determinadas obras, en sus últimas ediciones y suplementos entre ellas se encuentra “United States Pharmacopea” (USP 34), en la cual se señala que las empresas farmacéuticas deben implementar métodos de control para el proceso de producción, acorde con los requerimientos internacionales actuales, los cuales tienen que pasar por un proceso de validación, definida como la confirmación mediante el suministro de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista (ISO 9000-2000), demostrando la fiabilidad del método, requisito primordial cuando deseamos obtener resultados técnicamente válidos, exactos y confiables (L&S Consultores, 2003).

Cuando se toma un método normalizado, éste ya se encuentra validado pero es necesario realizar una validación secundaria cuyo propósito es establecer que el método satisfaga realmente las necesidades del laboratorio (Sartory, 2005).

En nuestro país, existen reportes de validaciones fisicoquímicas para productos farmacéuticos pero aún no en validaciones microbiológicas. Esto es debido quizás al poco entendimiento de los parámetros que se encontraban definidos para pruebas químicas mas no para las microbiológicas (Sutton, 2005), cambiando esto en los últimos años donde las farmacopeas han proporcionado alcances para las pruebas microbiológicas.

Dentro de los productos farmacéuticos se encuentra el Tyrex jarabe cuyo principio activo es la teofilina, un alcaloide de la familia metilxantina que se usa para prevenir y tratar el asma bronquial, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y en la profilaxis y tratamiento enfisema pulmonar y como coadyuvante en el tratamiento de apnea neonatal. (Digemid, 2013). Estas enfermedades se encuentran dentro de las enfermedades respiratorias agudas las cuales representan en el Perú el 18% de morbilidad general siendo una de las principales causas de morbilidad en el país (INEI, 2009). El producto Tyrex jarabe pasa por diversos

controles de calidad descrito en la USP 34, entre estos se encuentran las pruebas microbiológicas las mismas que requieren de antemano una validación secundaria para estar acorde a las exigencias internacionales y nacionales, asimismo comprobar la fiabilidad bajo condiciones concretas de uso, así como situaciones que pudieran ocurrir cuando el uso del método sea extendido a la práctica (Curren, 1995), mediante parámetros y criterios estadísticos exigidos por la USP 34 y tener así la seguridad en la detección de posibles microorganismos que podrían llegar a afectar la salud de los consumidores.

# **HIPOTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPOTESIS**

El método de ensayo microbiológico planteado permitirá detectar microorganismos presentes en productos farmacéuticos líquidos no estériles de manera segura y confiable bajo los requerimientos planteados por la USP 34 y en distintas condiciones de trabajo.

## **OBJETIVOS**

### Objetivo general

- Validar un método de ensayo cuali-cuantitativo para el análisis microbiológico del jarabe Tyrex a nivel intralaboratorial siguiendo las recomendaciones de la “United States Pharmacopea XXXIV” (USP 34).

### Objetivos específicos

- Establecer un método de ensayo microbiológico seguro y confiable para dicho producto en condiciones concretas
- Hallar la dilución de trabajo de las diferentes cepas a usar durante el proceso de validación.
- Evaluar distintos rangos de variación del método de ensayo que se pudieran dar durante el proceso de análisis.
- Comprobar la calidad de los medios de cultivos microbiológicos a usar en el ensayo.
- Determinar la especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, tolerancia, repetibilidad, reproducibilidad, robustez y linealidad del ensayo cuantitativo.
- Determinar la especificidad, límite de detección, tolerancia y robustez del ensayo cualitativo.

# **MARCO TEÓRICO**

## **INDUSTRIA FARMACÉUTICA, MEDICAMENTOS Y CONTROL DE CALIDAD**

La industria farmacéutica representa una de las industrias más organizadas y estrictas a nivel mundial debido a que la elaboración de medicamentos debe ser realizada de forma eficaz, eficiente y de alta calidad, ya que afecta directamente a la salud de los consumidores y representa gran importancia en la economía de los estados.

Los medicamentos representan el principal producto elaborado por el hombre. Su importancia radica en la ayuda a la recuperación de la salud perdida y en la prevención de enfermedades, lo cual es de gran consideración global. Son considerados como bienes de salud, que constituyen el recurso médico y terapéutico más frecuentemente utilizado (Tobar F., 2008). En el Perú las enfermedades respiratorias representan en promedio el 18% de la morbilidad general, pero en niños de 1 a 4 años representan el 31.4% (INEI, 2009), generando ello diversos medicamentos enfocados en el tratamiento de estas enfermedades y dentro de estos productos se encuentra el Tyrex jarabe, el cual es elaborado por el Instituto Quimioterápico S.A. y cuyo principio activo es la teofilina.

El mercado farmacéutico peruano está superando un ciclo recesivo, concordante con la situación del país. El asentamiento por décadas de centros de producción de propiedad de empresas extranjeras y nacionales ha permitido la formación de cuadros técnicos de alto nivel en los campos de la producción y control de calidad (Comisión para la promoción de exportaciones, 2003), a la vez, se ha visto una mayor exigencia a nivel global de estándares de calidad derivados de los acuerdos de unificación para aplicar las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) a los cuales el Perú no está ajeno, por el contrario, las empresas farmacéuticas se están comprometiendo a cumplir con dichos estándares propuestos (Organización Panamericana de Salud, 1998), y deben contar con un sistema de control de calidad que abarque todos los aspectos del proceso de elaboración, desde las materias primas empleadas hasta los productos terminados (Ley 26842 Cap III Art.59).

Las exigencias de los sistemas de calidad, centrados en un comienzo en los métodos químicos, hoy se aplican también a los métodos microbiológicos. Los procedimientos de prueba para la evaluación de los niveles de calidad de los artículos farmacéuticos están sujetos a diversos requisitos. Según el artículo 501 de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, los ensayos y especificaciones de las monografías de la Farmacopea de los Estados Unidos y el Formulario Nacional constituyen normas legales. Los reglamentos sobre principios de Buenas Prácticas de Manufactura vigentes requieren que los métodos de prueba deben cumplir normas adecuadas de exactitud y confiabilidad. Por consiguiente, si se requiere adoptar los procedimientos analíticos farmacopéicos; éstos deben estar respaldados por suficientes datos de laboratorio que documenten su validez.

En el Perú no existen reportes microbiológicos que evidencien que los métodos utilizados para el análisis de productos farmacéuticos se encuentren validados, por ello es necesario generar un plan de validación que nos permita tener la certeza que el método utilizado nos permite obtener resultados adecuados y confiables.

## **VALIDACIÓN**

Se define validación según el artículo 52° del “Manual de Buenas Prácticas de Manufactura” (DIGEMID, 2000), como la base para establecer procedimientos, procesos y asegurar la obtención de resultados deseados.

La validación de un proceso analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (USP 34, 2011).

La validación de un proceso es la piedra angular en el uso del método de evaluación de los medicamentos farmacéuticos (Ahmed et al, 2012).

La NTP ISO/TEC 17025 (INDECOPI, 2006), expresa que los laboratorios deben validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto.



Los laboratorios deben confirmar la fiabilidad del método en condiciones dadas por el laboratorio además de comprobar que pueden aplicar correctamente los métodos normalizados previos a su uso de ensayo o de calibración, cualquier variación en el método normalizado implica la repetición de dicha confirmación. Para el caso de metodologías de ensayo o de calibración desarrolladas por el laboratorio, los métodos deben ser adecuados y totalmente validados antes de su uso (Organismo Argentino de Acreditacion, 2003).

Los documentos ICH (International Conference on Harmonization) dan una guía sobre la necesidad de revalidación en las siguientes circunstancias: cambios en las síntesis de las sustancias o del principio activo, cambios en la composición del producto o del medicamento y cambios en los procesos analíticos. (USP 34, 2011).

Los tipos de validación son dos:

Validación primaria: Proceso exploratorio que tiene como metas establecer los límites operacionales y las características de desempeño de un método nuevo, modificado y/o caracterizado en forma inadecuada (Padilla, 2007).

Validación secundaria: Tiene lugar cuando un laboratorio procede a implementar un método desarrollado en otra parte, se centra en la reunión de evidencias de que el laboratorio está en capacidad de cumplir las especificaciones establecidas en la validación primaria. Asimismo, sirve para dar cumplimiento a las normas legales pertinentes y/o normas internacionales de calidad, contribuyendo a la credibilidad del laboratorio (Padilla, 2007).

## **PARÁMETROS ESTADÍSTICOS PARA VALIDAR**

La United States Pharmacopea (USP 34,2011) definen los criterios de validación, los cuales son: exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, tolerancia y robustez. Estas definiciones en sus inicios no estaban enfocadas para una validación microbiológica sino fisicoquímica, pero se propuso una redefinición por el subcomité microbiológico de la USP en que los divide por el tipo de prueba microbiológica. (Easter, 2005).

Existen tres tipos principales de pruebas microbiológicas, entre las que se incluyen pruebas para determinar si los microorganismos están presentes en una muestra, pruebas para cuantificar el número de microorganismos y pruebas destinadas a identificar microorganismos, esta última no incluida en el proceso de validación.

Las pruebas cualitativas sirven para detectar la presencia o ausencia de microorganismos y se caracterizan por el uso de la turbidez en un medio de crecimiento como evidencia de presencia de microorganismos viables.

Las pruebas cuantitativas para microorganismos sirven para estimar el número de microorganismos viables presentes en una muestra siendo el método de recuento en placa el ejemplo más común.

## **PARÁMETROS CUANTITATIVOS PARA RECuento MICROBIANO**

Según el tipo de prueba microbiológica se deberá considerar los parámetros especificados en la

**Tabla I.**

**Tabla I.** Parámetros de validación por tipo de prueba microbiológica

PARAMETRO	PRUEBAS CUALITATIVAS	PRUEBAS CUANTITATIVAS
EXACTITUD	NO	SI
PRECISION	NO	SI
ESPECIFICIDAD	SI	SI
LIMITE DE DETECCION	SI	SI
LIMITE DE CUANTIFICACION	NO	SI
LINEALIDAD	NO	SI

ROBUSTEZ	SI	SI
REPETIBILIDAD	SI	SI
TOLERANCIA	SI	SI

#### Especificidad:

La especificidad de un método microbiológico cuantitativo es su capacidad para detectar un panel de microorganismos que se puede esperar que estén presentes y así demostrar que el método sirve para los objetivos propuestos.

Es la capacidad del método de diferenciar específicamente el compuesto de interés, en presencia de los demás componentes.

En un procedimiento analítico, la especificidad puede establecerse mediante la adición al fármaco o producto farmacéutico de una cantidad conocida de microorganismos en concentraciones adecuadas, y la demostración de que estos microorganismos se recuperan adecuadamente. (USP 34,2011).

- Límite de detección

Es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede detectarse en condiciones experimentales indicadas.

El límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente. (USP 34,2011).

- Límite de cuantificación:

El límite de cuantificación es el límite más bajo de microorganismos que pueden contarse con exactitud. Dado que no es posible obtener una muestra confiable que tenga un número conocido de microorganismos, es esencial que el límite de cuantificación se determine a partir de un número de repeticiones ( $n > 5$ ) en al menos 5 puntos diferentes. El límite de cuantificación se expresa habitualmente en forma de concentración del analito (porcentaje de recuperación). La recuperación debe ser igual o mayor del 50 % de cada microorganismo recuperado de sus respectivos controles. (USP 34,2011).

Según el método a validar la mínima unidad cuantificable es 5 ufc, es decir una colonia es equivalente a esta cantidad según la fórmula:

$$\frac{\text{Numero de colonias halladas}}{\text{Cantidad de inóculo}} \times \frac{\text{Inversa de la dilución}}{\text{Número de placas}} = \text{Unidades formadoras de colonias por mL}$$

Es decir:

$$\frac{1 \text{ colonia}}{1 \text{ mL}} \times \frac{10}{2 \text{ placas}} = 5 \text{ Unidades formadoras de colonias por mL}$$

- Repetibilidad (Precisión):

Es la proximidad entre los resultados de la prueba obtenidos mediante el procedimiento y el valor verdadero. Se debe evaluar en muestras (del fármaco o del producto farmacéutico) a las que se haya agregado cantidades conocidas de microorganismos. Se calcula la cantidad de microorganismos basándose en la comparación de su respuesta

Es el grado de coincidencia entre los resultados de las pruebas individuales y se expresa como la desviación relativa (DSR), la cual debe ser menor o igual a 0.02 de cada analista. (USP 34,2011).

- Reproducibilidad :

Parámetro definido como la proximidad de los resultados y se expresa como el porcentaje de recuperación de los microorganismos. Expresa la precisión del método de análisis cuando es realizado por diferentes analistas y bajo condiciones ligeramente diferentes, tales como distintos laboratorios, reactivos de distintas marcas, equipos de trabajo diferentes, etc (Silva,2004).

Los resultados obtenidos entre analistas deben compararse y presentar una desviación estándar relativa (DSR) menor o igual a 0.02. (USP 34,2011).

- Robustez:

Parámetro definido como la medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas. Se debe obtener resultados de recuento con un porcentaje de cambio máximo 15% de variación. (USP 34,2011).

- Linealidad:

La linealidad de una prueba microbiológica cuantitativa es su capacidad para generar resultados que sean proporcionales a la concentración de microorganismos presentes en la muestra dentro de un intervalo dado. La linealidad debería determinarse en el intervalo de la prueba. Un método para su determinación consiste en seleccionar por lo menos 5 concentraciones de cada microorganismo de desafío estándar y llevar a cabo por lo menos 5 lecturas repetidas de cada concentración. Una medida adecuada sería calcular el cuadrado del coeficiente de correlación ( $r^2$ ), a partir de un análisis de

regresión lineal de los datos generados previamente. Aunque el coeficiente de correlación no provee una estimación de linealidad, es una medida conveniente y usualmente aplicada para aproximar la relación. El método no debería tener un  $r^2$  menor de 0.95. (USP 34,2011).

- Tolerancia:

Es el grado de precisión de los resultados de la prueba obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras bajo diversas condiciones normales de prueba, tales como el empleo de analistas, instrumentos, lotes de reactivos y laboratorios diferentes. (USP 34,2011).

## **PARÁMETROS CUALITATIVOS AUSENCIA-PRESENCIA**

- Robustez:

Parámetro definido como la medida de su capacidad para no ser afectado por variaciones pequeñas, aunque deliberadas. Se puede determinar durante la etapa de desarrollo del método, es un componente necesario de validación ya que permite que se conozca los parámetros operativos del método. (USP 34,2011).

- Tolerancia:

Es el parámetro definido como la resistencia intrínseca a influencias ejercidas por variables operativas y ambientales, es el grado de precisión de los resultados de la prueba obtenidos mediante el análisis de las mismas muestras bajo diversas condiciones normales de prueba, tales como el empleo de analistas, instrumentos, lotes de reactivos y laboratorios diferentes. (USP 34,2011).

- Límite de detección

Es el número más bajo de microorganismos en una muestra que puede detectarse bajo las condiciones experimentales establecidas.

El límite de detección se determina generalmente mediante el análisis de muestras con concentraciones conocidas de analito, estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse confiablemente. (USP 34,2011).

- Especificidad:

La especificidad de un método microbiológico cualitativo es su capacidad para detectar una gama de microorganismos que pueden estar presentes en el artículo de prueba. Este problema se enfrenta de manera adecuada a través de la promoción de crecimiento en los medios para demostrar la presencia o ausencia de microorganismos. (USP 34,2011).

## TEOFILiNA

La teofilina es un alcaloide de la familia metilxantina, la misma a la que pertenecen la cafeína y la teobromina (Barnes, 2010). Obteniendo sus características de ser estimulantes del sistema nervioso central y broncodilatadores. Su nombre químico es: 1,3 dimetilxantina siendo su estructura química:

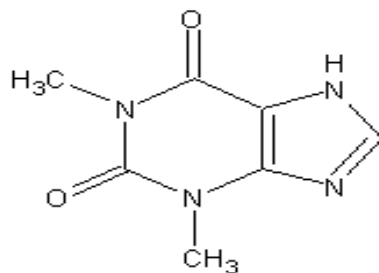


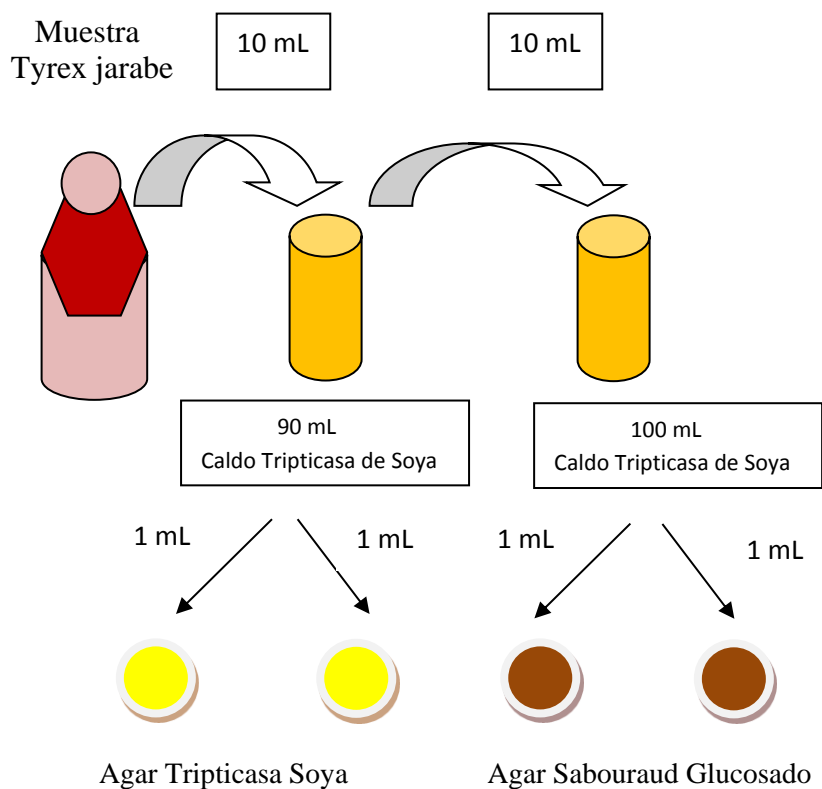
Fig.1 Estructura química 1,3 dimetilxantina

La teofilina es principalmente un broncodilatador que actúa relajando el músculo liso de los bronquios y de los vasos pulmonares, aliviando el broncoespasmo y aumentando las velocidades de flujo y la capacidad vital por inhibición de la fosfodiesterasa y por probable antagonismo de la adenosina y, cuando es suministrado a dosis bajas tiene también moderadas propiedades antiinflamatorias. (DIGEMID, 2008)

Actúa también como estimulante respiratorio, estimulación a nivel de la corteza cerebral, sensación de calor en la piel, y pesadez de piernas y brazos.

La Teofilina sigue siendo uno de los fármacos más ampliamente prescritos para el tratamiento del asma y el broncoespasmo en todo el mundo, ya que es barato y ampliamente disponible. (Barnes, 2010).

En el mercado farmacéutico la teofilina se encuentra con diferentes nombres y uno de ellos es Tyrex jarabe el cual es elaborado por Instituto Quimioterápico S.A. Este producto es elaborado bajo los estrictos parámetros de calidad y bajo la normatividad de la USP. El método microbiológico realizado para este producto es el siguiente basado en la USP 34.





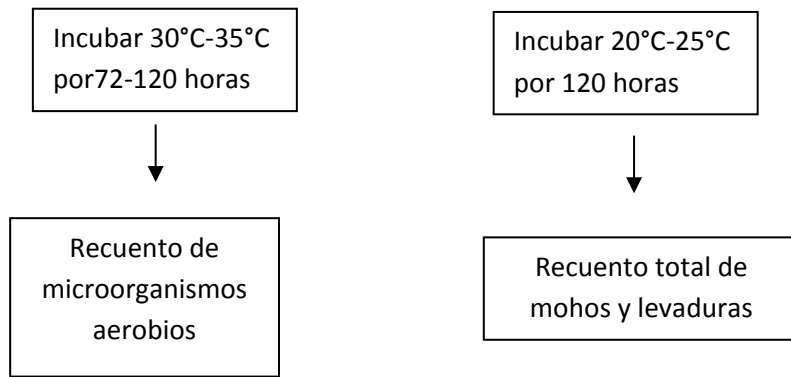
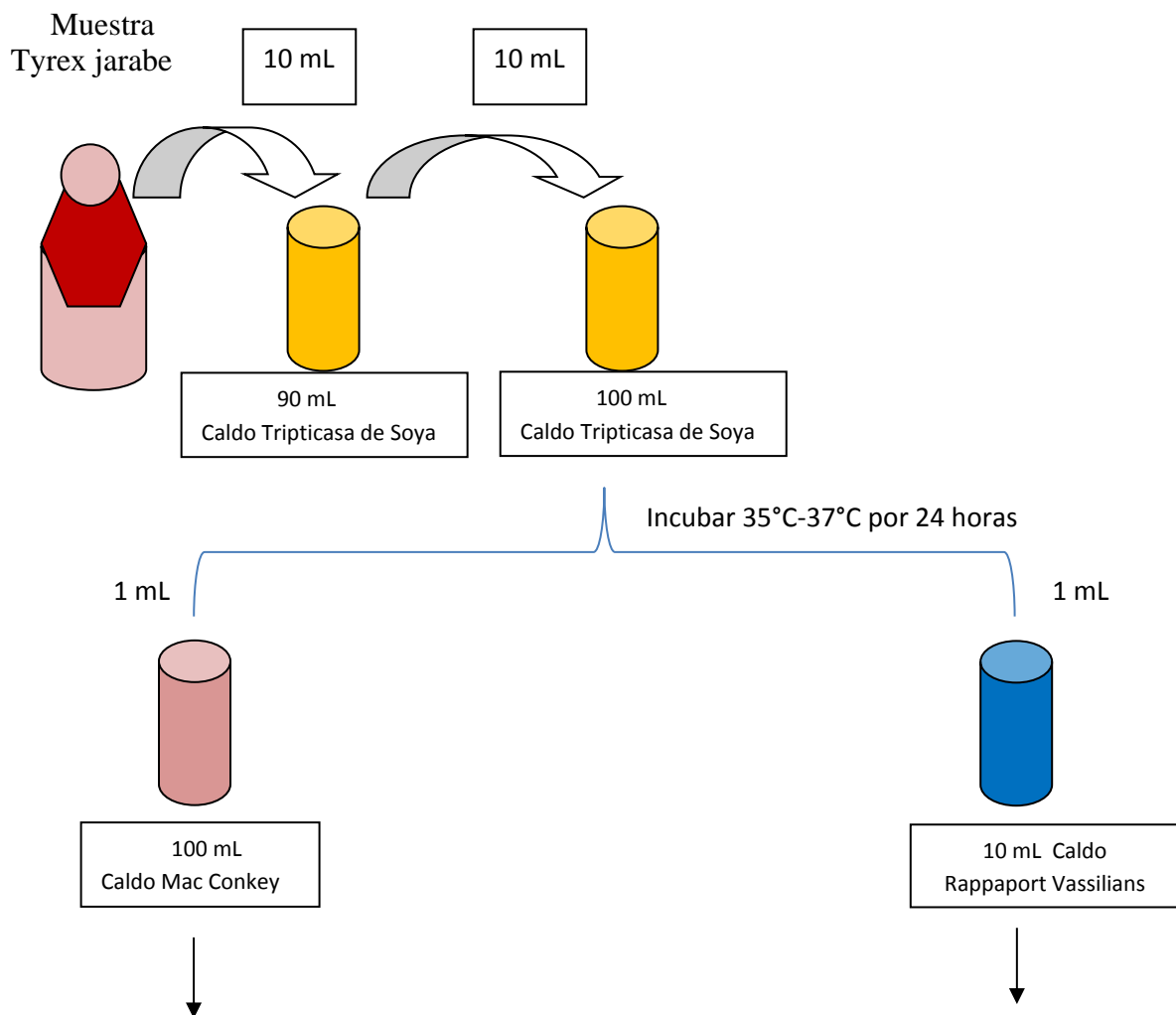


Fig.2 Método microbiológico normalizado para el análisis del producto Tyrex jarabe según USP 34- Prueba de recuento microbiano.



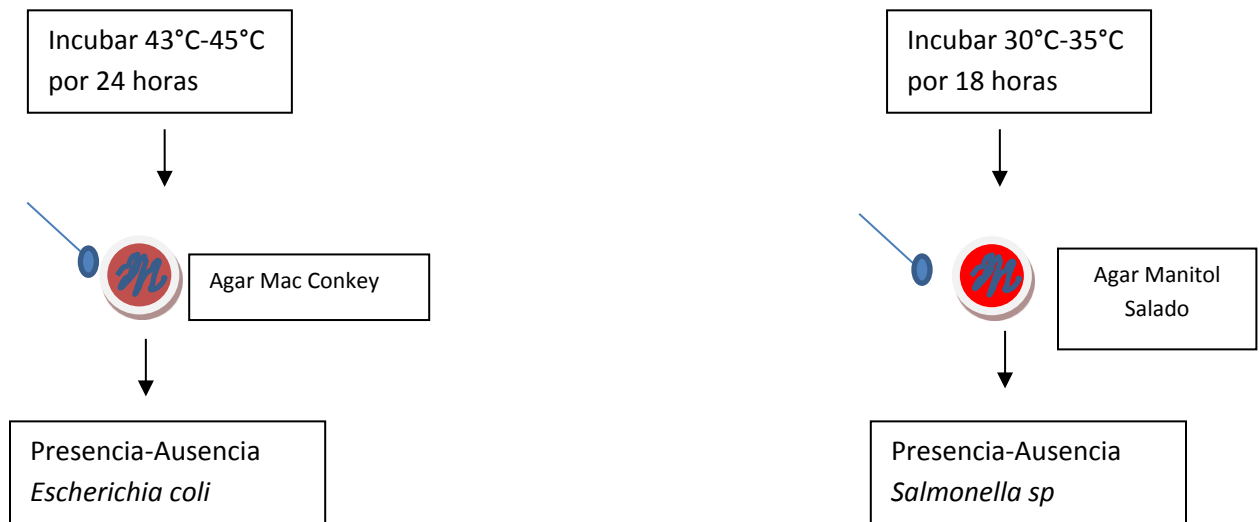


Fig.3 Método microbiológico normalizado por el análisis del producto Tyrex jarabe según USP 34-Prueba de microorganismos específicos.

La USP 34 está vigente desde el 1ero de mayo del 2011, pero se apreció diversos cambios en los análisis microbiológicos para los productos farmacéuticos a partir de la USP 32 manteniéndose estos cambios hasta la actualidad. Entre los muchos cambios se encuentra el uso de Caldo Tripticasa de Soya (TSB) como medio de enriquecimiento para *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Esto debido a que se observó que el uso de Caldo Lactosado como se hacía anteriormente no es muy efectivo, ya que sólo el 85% de subespecies IIIb de *Salmonella* son capaces de fermentar lactosa, las demás subespecies no lo hacen, asimismo, *E. coli* como *Salmonella spp.* crecen muy bien en TSB porque la glucosa y no la lactosa es el azúcar de preferencia para estos organismos (Clontz, 2009). Otro cambio que se aprecia, es la exigencia de determinados microorganismos dependiendo del tipo de presentación de los productos farmacéuticos, debido a que no es necesario detectar la ausencia de todos los microorganismos específicos.

Para el caso de los jarabes en los cuales se encuentra el Tyrex se exige la determinación de ausencia de *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* (USP 34, 2011)

## MATERIAL Y MÉTODOS

### MATERIAL

#### MATERIAL BIOLÓGICO

Se usaron cepas ATCC en cuarto pasaje obtenidas del cepario del área de microbiología del Instituto Quimioterápico S.A. Las cepas ATCC fueron adquiridas de Microbiologics S.A en segundo pasaje, proveedor certificado para la importación de cepas de la casa matriz. ATCC (American Type Culture Collection).

Para el método cuantitativo se usaron las siguientes cepas:

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Lote:485-123	Fecha :30-06-2011
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Lote:484-205	Fecha :05-05-2011
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	Lote:486-132	Fecha :03-03-2011

<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Lote:443-183	Fecha: 02-08-2011
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	Lote:39244	Fecha: 15-02-2010

Método Cualitativo – Ausencia Presencia : Para el método Cualitativo (Ausencia/Presencia) se usaron las siguientes cepas:

<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Lote:483-183	Fecha: 30-06-2011
<i>Salmonella enterica</i>	ATCC 14028	Lote:363-122	Fecha: 04-05-2011

## **PRODUCTO FARMACÉUTICO LÍQUIDO NO ESTÉRIL**

Se usaron 2 lotes distintos del producto Tyrex jarabe (Teofilina 27 mg/5 mL jarabe)

- Tyrex 27 mg/5 mL jarabe L:00510859
- Tyrex 27 mg/5 mL jarabe L:00611799

## **MATERIAL DE LABORATORIO.**

- **EQUIPOS**

Cabina de Flujo Laminar Esco

Incubadora Belnet (30°C - 35°C)

Incubadora Memmert (20°C - 25°C)

Autoclave Fravill ( 121°C +/- 1°C)

Horno Esterilizador Memmert (180 °C +/- 2°C)

Baño María Memmert (45°C +/-0.5 °C )

Baño María Digital VWR (42°C - 44°C)

Balanza Digital Adventurer Ohaus

Cuenta Colonias Hellige

Horno Microondas LG

Vórtex Maxl Mix II

Centrífuga Hettich

Micropipeta Brand 0,5-5 mL

Micropipeta Brand 10-100 uL

- **MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS**

Agar Tripticasa de Soya

Agar Sabouraud Glucosado

Caldo Tripticasa de Soya

Lecitina de soya

Polisorbato 20

Polisorbato 80

Caldo Mac Conkey

Agar Mac Conkey

Caldo Rappaport Vassiliadis

Agar XLD

Buffer fosfato pH 7.2

Cloruro de Sodio

Ácido Clorhídrico

Hidróxido de Sodio

- **MATERIAL DE VIDRIO.**

Placas Petri

Pipetas

Frascos de vidrio

Probeta

Matraces de vidrio  
Tubos de vidrio  
Espátulas de Drigalsky

- **OTROS**

Agua destilada  
Asas de siembra  
Cinta calor húmedo  
Cinta calor seco  
Tiras de pH  
Gasa  
Algodón  
Papel aluminio  
Guantes quirúrgicos

## **MÉTODOS**

### **TIPO DE ESTUDIO**

El presente estudio fue de tipo prospectivo. Se logró demostrar y establecer una evidencia documentada de que el método propuesto por la USP hace lo que estaba previsto, es decir nos permitirá detectar microorganismos en el jarabe Tyrex bajo condiciones concretas de trabajo.

### **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

- **Preparación de cepas de prueba.**

Se utilizaron las cepas microbianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella enterica* ATCC 14028 obtenidas del cepario del área de Microbiología del Instituto Quimioterápico S.A., las cuales corresponden a microorganismos viables en cuarto pasaje según las recomendaciones de la USP 34.

#### ○ **Preparación de bacterias**

Se realizó la reactivación de cada uno de los microorganismos bacterianos utilizados en el ensayo, en 10 mL Caldo Trypticase de Soya (TSB) y se incubaron a 30°C-35°C por 24 horas. Luego se tomó un inóculo de 0.1 mL de cada una de ellas y se sembraron en placas petri conteniendo Agar Trypticase de Soya (TSA) por el método de diseminación con la ayuda de una espátula Drigalsky, se incubaron a 30°C-35°C por 24 horas. Transcurrido el tiempo se procedió a añadir 10 mL de solución salina a cada una de las placas y con la ayuda del asa de siembra se logró recuperar las cepas, se colectaron estas resuspensiones bacterianas con la ayuda de una pipeta estéril de 5 mL a tubos de vidrio estériles. Luego se tomó 10 uL de cada una de las resuspensiones bacterianas y se colocaron a tubos conteniendo 10 mL de solución salina, escala Mac Farland N°1. De estas concentraciones, se realizaron diluciones sucesivas utilizando 9 mL de buffer fosfato pH 7.2, se tomó 1 mL de cada dilución y se colocaron a placas Petri realizando esta operación por duplicado determinando así la dilución en la cual se obtiene no más de 100 ufc en placa (dilución de trabajo), según las recomendaciones de la USP 34.

#### ○ **Preparación de levaduras**

Se reactivó la cepa *Candida albicans* en Caldo Sabouraud Glucosado y se incubó a 20 °C - 25 °C por 48 horas. Luego se tomó un inóculo de 0,1 mL y se

sembró a una placa Petri conteniendo Agar Sabouraud Glucosado por el método de diseminación con la ayuda de una espátula Drigalsky, y se incubó a 20 °C - 25 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo se procedió a añadir 10 mL de solución salina a la placa y con la ayuda del asa de siembra se logró recuperar las cepas, se colectó esta resuspensión con la ayuda de una pipeta estéril de 5 mL a un tubo de vidrio estéril. Luego se tomó 10 uL de esta resuspensión y se colocó a un tubo conteniendo 10 mL de solución salina, obteniendo una concentración comparada a la escala Mac Farland N°1. De esta concentración, se realizaron diluciones sucesivas utilizando 9 mL de buffer fosfato pH 7.2, se tomó 1 mL de cada dilución y se colocaron a placas Petri realizando esta operación por duplicado determinando así la dilución en la cual se obtiene no más de 100 ufc en placa (dilución de trabajo), según las recomendaciones de la USP 34.

- **Preparación de hongos filamentosos**

Se reactivó la cepa *Aspergillus niger* sembrándolo en una placa con Agar Sabouraud Glucosado y se incubó de 20°C-25°C por 5 días. Luego se cosechó utilizando 50 mL de solución salina más 0,05% de Polisorbato 80 y se colocó en un frasco estéril. De esta concentración se realizaron diluciones sucesivas utilizando buffer fosfato pH 7.2 y se inoculó 1 mL en una placa Petri por duplicado determinando así la dilución en la cual se obtiene no más de 100 ufc en placa (dilución de trabajo), según las recomendaciones de la USP 34.

- **Determinación de la calidad de los medios de cultivo**



- **CONTROL POSITIVO DE LOS MEDIOS**

Para evitar la alteración de los resultados en los diferentes ensayos se comprobó la calidad de los medios evaluando el crecimiento microbiano en los lotes de cada medio utilizado en el estudio. Se usaron las cepas de prueba de acuerdo con el tipo de medio a evaluar según las recomendaciones de la USP34.

**Control positivo caldo Tripticasa de Soya (TSB)**

Se sembró *Bacillus subtilis* procedente del cepario del laboratorio, en 5 tubos conteniendo Caldo Tripticasa de Soya y se incubó a 30°C - 35°C por 18 a 24 horas. Esto se repitió por cada lote del medio a utilizar en los ensayos.

**Control positivo de Agar Tripticasa de Soya (TSA)**

Se sembró *Bacillus subtilis* procedente del cepario del laboratorio, en 5 tubos conteniendo Caldo Tripticasa de Soya y se incubó a 30 -35°C por 18 a 24 horas, luego del tiempo de incubación se sembró por estriado en placas conteniendo 15 mL de Agar Tripticasa de Soya. Este proceso se repitió por cada lote de medio utilizado.

**Control positivo de Agar Sabouraud Glucosado**

Se sembró *Candida albicans* en tubos conteniendo Caldo Sabouraud Glucosado por 48 horas a 20-25°C por 3 días, luego del tiempo de incubación se sembró por estriado en placas conteniendo 15 mL de Agar Sabouraud Glucosado. Este proceso se repitió por cada lote de medio utilizado.

#### ○ **PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO PARA MEDIOS**

Para comprobar que los medios de cultivo se encuentran en óptimas condiciones se evaluó el crecimiento microbiano con una cantidad conocida de inóculo en los lotes de cada medio utilizado en el estudio. Se usaron las cepas de prueba de acuerdo con el tipo de medio a evaluar con una recuperación no menor del 50% según las recomendaciones de la USP34.

##### **Promoción de crecimiento del medio Agar Tripticasa de Soya**

Se inoculó 1 mL de la dilución de trabajo de los microorganismos: *Staphylococcus aureus* ( $10^{-6}$ ), *Pseudomonas aeruginosa* ( $10^{-5}$ ), *Bacillus subtilis* ( $10^{-5}$ ), *Candida albicans* ( $10^{-5}$ ) y *Aspergillus niger* ( $10^{-4}$ ), en placas Petri por duplicado y se agregó 15 a 20 mL de medio de cultivo Agar Tripticasa de Soya, además se realizó el control negativo del medio de cultivo, agregando 15 a 20 mL en una placa de vidrio estéril. Se incubó a 30 °C - 35°C por no más de 3 días.

##### **Promoción de crecimiento del medio Agar Sabouraud Glucosado**

Se inoculó 1 mL de la dilución de trabajo de los microorganismos: *Candida albicans* ( $10^{-5}$ ) y *Aspergillus niger* ( $10^{-4}$ ) en placas Petri por duplicado y se agregaron 15 a 20 mL de medio de cultivo Agar Sabouraud Glucosado además se realizó el control negativo del medio de cultivo, agregando 15 a

20 mL en una placa de vidrio estéril. Se incubó a 20 - 25°C por no más de 5 días.

### **Promoción de crecimiento para el medio Caldo Tripticasa de Soya**

Se repartió 10 mL Caldo Tripticasa de Soya en tubos estériles y se inoculó 1 mL de la dilución de trabajo del microorganismo *Bacillus subtilis* ( $10^{-5}$ ), además se realizó el control negativo del medio de cultivo agregando 10 mL en un tubo de vidrio estéril. Se incubó a 30 - 35°C por 18 a 24 horas. El crecimiento obtenido en el medio de cultivo se evidenció por turbidez del medio líquido el cual fue comparado con un lote anterior aprobado.

### **Promoción de crecimiento de los medios Caldo Mac Conkey y Agar Mac Conkey**

Se inoculó 1 mL de la dilución de trabajo de la cepa *Escherichia coli* en Caldo Mac Conkey y 0.1 mL de una dilución anterior de la dilución de trabajo al Agar Mac Conkey. Para el Agar Mac Conkey se empleó el método de estriado utilizando un asa de Koll. Para el Caldo Mac Conkey se usó 100 mL de este medio y se inoculó la cepa seleccionada, asimismo se realizaron controles negativos de los medios de cultivo a usar. Se incubó a 30 - 35°C por 18 a 24 horas. Al mismo tiempo se evaluaron las propiedades inhibitorias de estos medios, para esto se procedió a inocular 1 mL de la dilución de trabajo de *Staphylococcus aureus* ( $10^{-6}$ ) en Caldo Mac Conkey y Agar Mac Conkey de la misma manera descrita anteriormente. Se realizó el control negativo de los medios de cultivo, agregando 15 a 20 mL de Agar Mac Conkey en una placa de vidrio estéril y 10 mL de caldo Mac Conkey en tubo de vidrio estéril y se incubó a 30 - 35°C por 18 a 24 horas.

### **Promoción de crecimiento de los medios Caldo Rappaport Vassillians y Agar XLD**

Se inoculó 1mL de la dilución de trabajo de la cepa *Salmonella enterica* en 10 mL Caldo Rappaport Vassiliadis. Asimismo se inoculo 0.1 mL de una dilución anterior a la dilución de trabajo a placas conteniendo Agar XLD. Al mismo tiempo se evaluaron las propiedades inhibitorias de estos medios, para esto se procedió a inocular 1 mL de la dilución de trabajo de *Staphylococcus aureus* ( $10^{-6}$ ) en Caldo Rappaport Vassiliadis y Agar XLD. Tambien se realizó el control negativo de los medios de cultivo, agregando 15 a 20 mL de Agar XLD en una placa de vidrio estéril y 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis en tubo de vidrio estéril y se incubó a 30 a 35°C por 18 a 24 horas.

- **PREPARACIÓN DEL PLACEBO (MEDIO DE CULTIVO + PRODUCTO)**

Se transfirieron 10 mL del producto en condiciones asépticas a un frasco conteniendo 90 mL de Caldo Tripticasa de Soya más lecitina al 0,5 % y polisorbato 20 al 4% como agentes neutralizantes de los agentes antimicrobianos contenidos en el producto farmacéutico evaluado. Ambos neutralizan compuestos de amonio cuaternario y parahidroxibenzoatos según referencia de la USP34.

## **PARÁMETROS ESTADÍSTICOS**

- **Parámetros cuantitativos para recuento microbiano**

Estas pruebas se emplearon para estimar el número de microorganismos viables presentes en la muestra. El método de recuento en placa es el más común de esta clase de pruebas y la que se usó para la técnica a validar.

## Especificidad

Para la determinación de este parámetro se evaluó el diluyente, el producto y los neutralizantes con un determinado inóculo de cada microorganismo de prueba.

### ➤ Evaluación del diluyente

Para comprobar que los neutralizantes a utilizar no interfieren en el proceso de recuperación, se evaluaron dos diluyentes: el Caldo Trypticasa de Soya y el Caldo Trypticasa de Soya más neutralizantes (lecitina 0,5% y polisorbato 20 al 4 %), siendo el segundo el medio diluyente usado.

Se prepararon 30 tubos (repeticiones) con 9 mL para cada uno de los diluyentes y se inoculó 1 mL de las diferentes cepas de prueba en su respectiva dilución de trabajo (100 ufc/mL).

Luego se colocó por duplicado 1 mL de cada tubo a placas Petri estériles y se incorporó 15 a 20 mL de TSA previamente fundido y enfriado a 45°C aproximadamente. Se incubaron las placas a 30 - 35 °C por 24 a 48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las colonias.

### ➤ Evaluación del producto y neutralizante

Para evitar errores en los resultados es necesario comprobar que los neutralizantes, al interaccionar con el producto, no ejerzan influencia sobre éste en su recuperación microbiana. Para esto se evaluarón 3 diluyentes: TSB, TSB mas producto y TSB + neutralizantes y producto.

Se prepararon 30 tubos (repeticiones) con 9 mL para cada uno de los diluyentes y se inoculó 1 mL de las diferentes cepas de prueba en su respectiva dilución de trabajo.

Luego se colocó por duplicado 1 mL de cada tubo a placas Petri estériles y se incorporó 15 a 20 mL de TSA previamente fundido y enfriado a 45°C aproximadamente. Se incubaron las placas a 30 - 35 °C por 24 a 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las colonias.

### Límite de detección

Para la obtención de este parámetro se determinó la dilución mínima de cada cepa de prueba que nos permita inocular aproximadamente 5 ufc/mL. Se prepararon 06 tubos conteniendo 9 mL de placebo para cada microorganismo prueba (5 cepas), se inoculó 0,5 mL de una dilución posterior a la dilución de trabajo, luego se colocó 1 mL de cada tubo en placas Petri estériles y se añadió 15 mL del medio de cultivo Agar Tripticasa de Soya y se incubó a 30- 35 °C por 24 a 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las colonias.

### Límite de cuantificación

Para la obtención de este parámetro se prepararon 06 tubos conteniendo 9 mL del diluyente más neutralizante por cada microorganismo ensayado (5 cepas), se inoculó 0,5 mL de una dilución menor a la dilución de trabajo (5 ufc) y se colocó 1 mL de cada tubo en placas Petri estériles y se añadió 15 mL del medio de cultivo Agar Tripticasa de Soya y se incubó a 30 -35 °C por no más de 3 días para las bacterias y no más de 5 días para levaduras y hongos. Se procedió a hacer lo mismo utilizando el placebo. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura de las colonias.

### Estudio de tolerancia

Se determinó este parámetro utilizando para la preparación del placebo 3 lotes diferentes de medios de cultivos y variación de marcas y el mismo lote del producto. Se enfrentó con el microorganismo *Staphylococcus aureus* inoculando 1mL de la dilución de trabajo (100 ufc/mL), debiendo encontrar resultados conformes con la recuperación del microorganismo indicado en el Recuento de Microorganismos Aerobios Mesofilos.

### Estudio de Repetibilidad y Reproducibilidad (Precisión y Exactitud)

#### ➤ Repetibilidad:

Para evaluar este parámetro se inoculó 1mL de *Staphylococcus aureus* en su respectiva dilución de trabajo ( $10^{-6}$ ) a dos placas Petri y se añadió 15 a 20 mL de Agar Tripticasa de Soya, se realizó 10 veces. Luego se incubaron las placas a 30 - 32,5 °C. Transcurrido el tiempo de incubación 3 analistas realizaron las lecturas de las placas y se obtuvo la variación en las lecturas de cada uno de ellos (DSR).

#### ➤ Reproducibilidad:

Para evaluar este parámetro se inoculó 1mL de *Staphylococcus aureus* en una dilución menos a la dilución de trabajo ( $10^{-5}$ ) en 9 mL de placebo y se colocó 1 mL a una placa Petri por duplicado y se añadió 15 a 20 mL de Agar Tripticasa de Soya, este proceso se realizó 10 veces. Luego se incubaron las placas a 30 - 32,5 °C. Transcurrido el tiempo de incubación 3 analistas realizaron las lecturas de las placas y se obtuvo la variación de sus lecturas entre analistas (DSR).

### Robustez

Para evaluar este parámetro se inoculó 1mL de *Staphylococcus aureus* en una dilución menos a la dilución de trabajo ( $10^{-5}$ ) en 9 mL de placebo y se colocó 1 mL a una placa Petri por duplicado y se añadió 15 a 20 mL de Agar Tripticasa de Soya, este proceso se realizó 10 veces. Luego se incubaron las placas a 30 - 32,5 °C y se realizaron lecturas en 3 diferentes tiempos (T1: 72 horas, T2: 120 horas, T3: mayor a 120 horas).

### Linealidad

Se evaluó un producto farmacéutico líquido (Tyrex jarabe) enfrentándolo con cinco concentraciones de los microorganismos de prueba para el Recuento total de Microorganismos Aerobios. Se debe obtener recuentos en placa con un Coeficiente de correlación mayor al 0.95 por cada microorganismo evaluado, según lo exigido por la USP 34.

Se inocularon 5 concentraciones distintas de *Staphylococcus aureus* a 5 tubos conteniendo 9 mL del placebo y se colocó 1 mL en placa Petri y se añadió 15 mL de Agar Tripticasa de Soya. Se realizó 05 repeticiones del ensayo y se repitió usando las cepas de prueba faltantes. Se realizó el control usando 9 mL de diluyente más neutralizante repitiendo el mismo procedimiento y con las cinco cepas de prueba.

- **Parámetros cualitativos Ausencia –Presencia**

### Robustez



Se evaluó la capacidad del caldo de cultivo como fuente nutritiva en diferentes tiempos de incubación de los microorganismos *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* para su enriquecimiento.

Para la determinación de este parámetro se trabajó con 2 lotes diferentes de un producto farmacéutico líquido Tyrex jarabe para la preparación de los placebos. Se inoculó 1 mL de la dilución de trabajo ( $10^{-6}$ ) del microorganismo *Escherichia coli* en 10 mL de cada uno de los placebos. Se hicieron 3 réplicas por cada lote del producto leyendo resultados en 03 tiempos diferentes (T1: 17 horas, T2: 24 horas, T3: 48 horas). Luego de los tiempos establecidos se realizó resiembra 1 mL en 100 mL de Caldo Mac Conkey y se incubaron a 42-44 °C por 24 a 48 horas. Posteriormente se sembró en placas con Agar Mac Conkey y se incubaron a 30 -35°C por 18 a 72 horas.

Asimismo se inoculó 1 mL de la dilución de trabajo ( $10^{-6}$ ) del microorganismo *Salmonella enterica* en 10 mL de cada uno de los placebos. Se hicieron 3 réplicas por cada lote del producto leyendo resultados en 03 tiempos diferentes (T1: 17 horas, T2: 24 horas, T3: 48 horas). Luego de los tiempos establecidos se realizó resiembra 1 mL en 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis y se incubó a 30 - 35 °C por 18 a 24 horas. Posteriormente se sembró en placas con Agar XLD y se incubaron a 30 - 35°C por 18 a 48 horas.

### Tolerancia

Para la determinación de este parámetro se trabajó con 2 lotes diferentes de un producto farmacéutico líquido para la preparación de los placebos. Se inoculó 1 mL del microorganismos *Escherichia coli* en su respectiva dilución de trabajo ( $10^{-6}$ ) en 10 mL de cada uno de los placebos preparados y se incubó a 30-35°C por 24 a 48 horas. Luego del tiempo establecido se realizó resiembra de 1 mL en 100 mL de 03 lotes diferentes del medio Caldo Mac Conkey y se incubó a 42 - 44 °C por 24 a 48 horas.

Posteriormente se sembró en placas con Agar Mac Conkey se incubó de 30-35°C por 18 a 72 horas.

Asimismo se inoculó 1 mL del microorganismo *Salmonella enterica* en su respectiva dilución de trabajo ( $10^{-6}$ ) en 10 mL de cada uno de los placebos preparados, y se incubó a 30-35°C por 24 a 48 horas. Luego del tiempo establecido se realizó resiembras de 1 mL en 10 mL de 02 lotes diferentes del medio Caldo Rappaport Vassiliadis y se incubó a 30 - 35°C por 18 a 24 horas. Posteriormente se sembró en placas con Agar XLD se incubó a 30 a 35°C por 18 a 48 horas.

### Límite de detección

Para la obtención de este parámetro se determinó la dilución mínima de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* que permitió la inoculación aproximada de 5 ufc/mL.

Se trabajó con 2 lotes diferentes de un producto farmacéutico líquido Tyrex jarabe para la preparación de los placebos con 3 réplicas para cada lote. Se inoculó 0,5 mL de una dilución posterior a la dilución de trabajo del microorganismos *Escherichia coli* ( $10^{-7}$ ) y se colocó 10 mL de cada uno de los placebos preparados, se incubó a 30 - 35°C por 24 a 48 horas. Luego del tiempo establecido se realizó resiembras 1 mL en 100 mL Caldo Mac Conkey y se incubó a 42 - 44 °C por 24 a 48 horas. Posteriormente se sembró en placas con Agar Mac Conkey se incubó a 30 -35°C por 18 a 72 horas.

Asimismo, se inoculó 0,5 mL de una dilución posterior a la dilución de trabajo del microorganismo *Salmonella enterica* ( $10^{-7}$ ) y se colocó 10 mL de cada uno de los placebos preparados, se incubó a 30 -35°C por 24 a 48 horas. Luego del tiempo establecido se realizó resiembras 1 mL en 100 mL Caldo Rappaport Vassiliadis y se incubó a 18 - 24 °C. Posteriormente se sembró en placas con Agar XLD se incubó a 30 - 35°C por 18 a 48 horas.

## Especificidad

Para la determinación de este parámetro se trabajó con 2 lotes de un producto farmacéutico líquido para la preparación de los placebos. Se inoculó 1 mL del microorganismo *Escherichia coli* en su respectiva dilución de trabajo ( $10^{-6}$ ) en 10 mL de cada uno de los placebos preparados, se incubó a 30 - 35°C por 24 a 48 horas. Luego del tiempo se sembró por estriado en Agar Baird Parker y Manitol Salado y se incubó a 30 - 35°C por 18 a 72 horas. Asimismo se realizaron resiembras 1 mL en 100 mL del medio en Caldo MacConkey y se incubó a 42 - 44 °C por 24 a 48 horas para posteriormente sembrar en placas con Agar MacConkey y se incubó a 30 - 35°C por 18 a 72 horas.

Este procedimiento se repitió pero utilizando el microorganismo *Staphylococcus aureus* como control negativo.

Asimismo, se inoculó 1 mL del microorganismo *Escherichia coli* en su respectiva dilución de trabajo ( $10^{-6}$ ), en 10 mL de cada uno de los placebos preparados se incubó a 30 - 35°C por 24 a 48 horas. Luego del tiempo se sembró por estriado en Agar Baird Parker y Manitol Salado y se incubó a 30 - 35°C por 18 a 72 horas. Asimismo se realizaron resiembras 1 mL en 100 mL del medio en Rappaport Vassiliadis y se incubó a 30 - 35 °C por 18 a 24 horas para posteriormente sembrar en placas con Agar XLD y se incubó a 30 - 35°C por 18 a 48 horas.

Este procedimiento se repitió pero utilizando el microorganismo *Staphylococcus aureus* como control negativo

## RESULTADOS

## PREPARACIÓN DE CEPAS DE PRUEBA

Se evaluaron 06 cepas de prueba hallando su respectiva dilución de trabajo según el recuento observado el cual debe estar dentro del rango 20 a 200 ufc/placa. La dilución de trabajo obtenida de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella entérica* ATCC 14028 es  $10^{-6}$  (Tabla II, Tabla VII, Tabla VIII). La dilución de trabajo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, y *Candida albicans* ATCC 10231 resulto ser  $10^{-5}$  (Tabla III,

Tabla IV, Tabla V) y  $10^{-4}$  para *Aspergillus niger* ATCC 16404 (Tabla VI).

**Tabla II.** Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba *Staphylococcus aureus*

CEPAS	Diluciones ensayadas	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Promedio	DILUCIÓN DE TRABAJO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	$10^{-6}$	106	94	122	96	111	106	$10^{-6}$
	$10^{-5}$	1230	1111	1210	1180	1294	1205	

**Tabla III.** Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba *Bacillus subtilis*

CEPAS	Diluciones ensayadas	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Promedio	DILUCION DE TRABAJO
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	$10^{-5}$	33	26	22	26	30	27	$10^{-5}$
	$10^{-4}$	410	366	310	343	399	366	

**Tabla IV.** Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba *Pseudomonas aeruginosa*

CEPAS	Diluciones ensayadas	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Promedio	DILUCION DE TRABAJO
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	$10^{-5}$	73	66	81	61	68	70	$10^{-5}$
	$10^{-4}$	660	723	766	554	701	681	

**Tabla V.** Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba *Candida albicans*

CEPAS	Diluciones ensayadas	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Promedio	DILUCION DE
-------	----------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	----------	-------------

								TRABAJO
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	$10^{-5}$	113	100	118	94	120	109	$10^{-5}$
	$10^{-4}$	1200	934	1873	1334	2043	1477	

**Tabla VI.** Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba *Aspergillus niger*

CEPAS	Diluciones ensayadas	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Promedio	DILUCION DE TRABAJO
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	$10^{-4}$	65	71	63	82	69	70	$10^{-4}$
	$10^{-3}$	805	884	873	1032	802	879	

**Tabla VII.** Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba *Escherichia coli*

CEPAS	Diluciones ensayadas	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Promedio	DILUCION DE TRABAJO
<i>Escherichia coli</i> ATC C8739	$10^{-6}$	98	105	93	86	92	95	$10^{-6}$
	$10^{-5}$	1008	1232	1422	1025	1202	1178	

**Tabla VIII.** Determinación de la dilución de trabajo de la cepa de prueba *Salmonella entérica*

CEPAS	Diluciones ensayadas	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Promedio	DILUCION DE TRABAJO
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	$10^{-6}$	101	90	96	110	83	96	$10^{-6}$
	$10^{-5}$	1503	1010	1132	1227	1114	1197	

## CONTROL POSITIVO DE LOS MEDIOS

Se obtuvieron resultados conformes en todos los lotes y los diferentes medios utilizados en las pruebas como se puede apreciar en la **Tabla IX**, **Tabla X** y **Tabla XI**. La evaluación se hizo usando los microorganismos recomendados por la USP 34.

**Tabla IX.** Control positivo del medio Caldo Tripticasa de Soya

**CALDO TRIPTICASA DE SOYA**

LOTE	MICROORGANISMO <i>Bacillus subtilus</i> ATCC6633
8178/CRITERION	+
8113/CRITERION	+
7138/CRITERION	+

**Tabla X.** Control positivo del medio Agar Tripticasa de Soya

AGAR TRIPTICASA DE SOYA	
LOTE	MICROORGANISMO <i>Bacillus subtilus</i> ATCC6633
VM026859/MERCK	+
VM046959/MERCK	+

**Tabla XI.** Control positivo del medio Agar Sabouraud Glucosado

AGAR SABOURAUD GLUCOSADO		
LOTE	MICROORGANISMO <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	MICROORGANISMO <i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
09252/CRITERION	+	+
09197/CRITERION	+	+
08326/CRITERION	+	+

## PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO PARA MEDIOS

Se obtuvieron resultados conformes en la prueba de promoción de crecimiento de los medios usados en las diferentes pruebas y con los microorganismos recomendados en la USP 34. Para los medios utilizados en recuento se obtuvieron porcentajes de recuperación mayor al 50 % comparándolo con el control como se evidencia en la **Tabla XII** y **Tabla XIII**; y se obtuvieron crecimientos característicos en los medios líquidos tal como

observamos en la **Tabla XIV** así como, en los medios selectivos lo cual se aprecia en la **Tabla XV, Tabla XVI, Tabla XVII y Tabla XVIII.**

**Tabla XII.** Promoción de crecimiento para el Agar Tripticasa de Soya

**Tabla XIII.** Promoción de crecimiento para el medio Agar Sabouraud Glucosado

AGAR TRIPTICASA DE SOYA					
LOTE: VM026859/MERCK					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
Recuento obtenido en el medio control	106	73	26	81	66
Recuento obtenido en el medio de prueba	96	58	24	93	51
% de Recuperación (mayor al 50%)	<b>90.57%</b>	<b>79.45%</b>	<b>92.31%</b>	<b>114.82%</b>	<b>77.27%</b>
LOTE: VM046959/MERCK					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
Recuento obtenido en el medio control	96	46	43	86	43
Recuento obtenido en el medio de prueba	90	51	39	79	38
% de Recuperación (mayor al 50%)	<b>93.75%</b>	<b>110.87%</b>	<b>90.70%</b>	<b>91.86%</b>	<b>88.37%</b>

AGAR SABOURAUD GLUCOSADO		
LOTE: 09197/CRITERION		
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
Recuento obtenido en el medio control	102	56
Recuento obtenido en el medio de prueba	91	49
% de Recuperación (mayor al 50%)	<b>89.92%</b>	<b>87.50%</b>
LOTE: 09252/CRITERION		
	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
Recuento obtenido en el medio control	73	36
Recuento obtenido en el medio de prueba	62	39
% de Recuperación (mayor al 50%)	<b>84.93%</b>	<b>108.33%</b>
LOTE: 09197/CRITERION		
	<i>Candidaalbicans</i> ATCC 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
Recuento obtenido en el medio control	94	46
Recuento obtenido en el medio de prueba	101	40
% de Recuperación (mayor al 50%)	<b>107.45%</b>	<b>86.96%</b>



**Tabla XIV.** Promoción de crecimiento para el medio Caldo Trypticasa de Soya

CALDO TRIPTICASA DE SOYA			
	LOTE: 8178/CRITERION	LOTE: 8113/CRITERION	LOTE: 7138/CRITERION
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
Resultado obtenido en el medio control	+	+	+
Resultado obtenido en el medio de prueba	+	+	+
Conclusión	Conforme	Conforme	Conforme

**Tabla XV.** Promoción de crecimiento para el medio Caldo Mac Conkey

CALDO MAC CONKEY			
	LOTE: 210/CRITERION	LOTE: 7324/CRITERION	LOTE: 6233011/DIFCO
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739
Resultado obtenido en el medio control	+	+	+
Resultado obtenido en el medio de prueba	+	+	+
Conclusión	Conforme	Conforme	Conforme

**Tabla XVI.** Promoción de crecimiento para el medio Agar Mac Conkey

AGAR MAC CONKEY			
	LOTE: 8158/CRITERION	LOTE: 8100W/CRITERION	LOTE: 6167236/DIFCO
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739
Resultado obtenido en el medio control	+	+	+
Resultado obtenido en el medio de prueba	+	+	+
Conclusión	Conforme	Conforme	Conforme

**Tabla XVII.** Promoción de crecimiento para el medio Caldo Rappaport Vassiliadis

CALDO RAPPAPORT VASSILIADIS		
	LOTE: VM943900/MERCK	LOTE: VM214100/MERCK
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 8739	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 8739
Resultado obtenido en el medio control	+	+
Resultado obtenido en el medio de prueba	+	+
Conclusión	Conforme	Conforme

**Tabla XVIII.** Promoción de crecimiento para el medio Agar XLD

AGAR XLD		
	LOTE: VM907987/MERCK	LOTE: VM683587/MERCK
	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 8739	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 8739
Resultado obtenido en el medio control	+	+
Resultado obtenido en el medio de prueba	+	+
Conclusión	Conforme	Conforme

## PARÁMETROS CUANTITATIVOS PARA RECuento MICROBIANO

Se obtuvieron resultados conformes para los diferentes parámetros cuantitativos.

### Especificidad

Se comprobó que el método tiene la capacidad de detectar los microorganismos de prueba en presencia del diluyente, de neutralizantes y del producto. Además se demostró que los medios de cultivo específicos a usar promueven el crecimiento de los microorganismos y que los neutralizantes y el producto (Tyrex jarabe) no interfieren en la recuperación de los mismos.

### Evaluación del diluyente

Se evaluaron los 30 datos obtenidos del recuento usando el diluyente A (Caldo Tripticasa de Soya) y los 30 datos obtenidos del recuento usando el diluyente B (Caldo Tripticasa de Soya + Lecitina + Polisorbato 20) siendo este último el diluyente a utilizar en el método, se halló el promedio y la varianza de los logaritmos de los datos para cada uno de los diluyentes como se muestra en la **Tabla XIX**

**Tabla XIX.** Lecturas obtenidas en los diluyentes A y B

Muestra	Recuento Diluyente A (ufc/placa)	Recuento Diluyente B (ufc/placa)	Log del Rcto en Diluyente A	Log del Rcto en Diluyente B
1	86	89	1.9345	1.9494
2	98	94	1.9912	1.9731
3	103	97	2.0128	1.9868
4	88	110	1.9445	2.0414
5	97	94	1.9868	1.9731
6	100	97	2.0000	1.9868
7	95	93	1.9777	1.9685
8	100	102	2.0000	2.0086
9	91	90	1.9590	1.9542
10	95	94	1.9777	1.9731
11	105	106	2.0212	2.0253
12	87	87	1.9395	1.9395
13	97	95	1.9868	1.9777
14	97	95	1.9868	1.9777
15	98	102	1.9912	2.0086
16	85	88	1.9294	1.9445
17	86	90	1.9345	1.9542
18	93	90	1.9685	1.9542
19	90	90	1.9542	1.9542
20	82	83	1.9138	1.9191
21	86	82	1.9345	1.9138
22	97	103	1.9868	2.0128
23	83	83	1.9191	1.9191
24	104	104	2.0170	2.0170
25	95	97	1.9777	1.9868
26	92	90	1.9638	1.9542
27	101	99	2.0043	1.9956
28	105	106	2.0212	2.0253
29	78	89	1.8921	1.9494
30	85	98	1.9294	1.9912
PROMEDIO			1.9685	1.9745
VARIANZA			0.0012	0.0011

DiluyenteA: Caldo Tripticasa de Soya

Diluyente B: Caldo Tripticasa de Soya + Lecitina + Polisorbato 20

Microorganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Luego se procedió a analizar la homogeneidad de las varianzas aplicando para ello la prueba F de Fisher para varianzas de dos muestras planteando las siguientes hipótesis:

Ho: Var Diluyente A = Var Diluyente B  
 Ha: Var Diluyente A  $\neq$  Var Diluyente B

SI  $F_{\text{experimental}} < F_{\text{crítico}}$  entonces se acepta la Ho.

Se analizaron los datos, obteniéndose:

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	1.96853856	1.974517668
Varianza	0.001216909	0.001094689
Observaciones	30	30
Grados de libertad	29	29
F	1.111647884	
P( $F \leq f$ ) una cola	0.388787272	
Valor crítico para F (una cola)	1.860811949	

Resultando el F Experimental 1.111647884 y el F. Crítico 1.860811949, por lo tanto se acepta la hipótesis nula es decir, las varianzas del diluyente A y del diluyente B son iguales.

Luego al obtener este resultado se procedió a aplicar la prueba T Student para dos muestras con varianzas iguales, planteándose las siguientes hipótesis:

Ho: Promedio Diluyente A = Promedio Diluyente B  
 Ha: Promedio Diluyente A  $\neq$  Promedio Diluyente B

Si  $T_{\text{experimental}} < T_{\text{crítico}}$  entonces se acepta la Ho.

Se compararon los promedios de los diluyentes obteniendo los siguientes datos:

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Media	1.96853856	1.974517668
Varianza	0.001216909	0.001094689
Observaciones	30	30
Varianza agrupada	0.001155799	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	58	
Estadístico t	0.681147144	
P(T<=t) una cola	0.249244504	
Valor crítico de t (una cola)	1.671553491	
P(T<=t) dos colas	0.498489008	
Valor crítico de t (dos colas)	2.001715984	

Resultando el T. Experimental 0.681147144 y el T. Crítico 2.001715984 por lo tanto se acepta la hipótesis nula, es decir, el promedio de recuento ocasionado por el diluyente A es semejante al del diluyente B, con un 95 % de confianza.

### **Evaluación del producto y neutralizante**

Se evaluaron los datos obtenidos de los 3 tratamientos y se halló el promedio, la varianza y la suma de los logaritmos de los datos para cada uno de los tratamientos como puede apreciarse en la **Tabla XX**.

**Tabla XX.** Recuento obtenido del producto + diluyente, diluyente, producto + diluyente + Neutralizante

Tratamiento A: Diluyente (Caldo tripticasa de soya) + producto (Tyrex 27 mg/5mL jarabe)

Muestra	Tratamiento A (ufc/placa)	Tratamiento B (ufc/placa)	Tratamiento C (ufc/placa)	Log Producto	Log Diluyente	Log Neutralizante
1	177	170	170	2.2480	2.2304	2.2304
2	176	196	182	2.2455	2.2923	2.2601
3	163	163	165	2.2122	2.2122	2.2175
4	168	168	157	2.2253	2.2253	2.1959
5	192	193	192	2.2833	2.2856	2.2833
6	179	190	175	2.2529	2.2788	2.2430
7	184	182	182	2.2648	2.2601	2.2601
8	154	169	171	2.1875	2.2279	2.2330
9	160	168	161	2.2041	2.2253	2.2068
10	168	189	170	2.2253	2.2765	2.2304
11	182	181	182	2.2601	2.2577	2.2601
12	188	187	188	2.2742	2.2718	2.2742
13	161	160	170	2.2068	2.2041	2.2304
14	190	190	190	2.2788	2.2788	2.2788
15	186	182	163	2.2695	2.2601	2.2122
16	174	175	177	2.2405	2.2430	2.2480
17	182	195	192	2.2601	2.2900	2.2833
18	173	171	171	2.2380	2.2330	2.2330
19	159	149	148	2.2014	2.1732	2.1703
20	197	193	180	2.2945	2.2856	2.2553
21	201	200	199	2.3032	2.3010	2.2989
22	175	179	171	2.2430	2.2529	2.2330
23	155	165	164	2.1903	2.2175	2.2148
24	174	175	172	2.2405	2.2430	2.2355
25	164	166	163	2.2148	2.2201	2.2122
26	175	184	182	2.2430	2.2648	2.2601
27	176	176	181	2.2455	2.2455	2.2577
28	194	199	204	2.2878	2.2989	2.3096
29	190	188	188	2.2788	2.2742	2.2742
30	176	181	206	2.2455	2.2577	2.3139
PROMEDIO				2.2455	2.2529	2.2472
VARIANZA				0.0010	0.0010	0.0011
SUMA DE VARIANZA				0.0031		

Tratamiento B: Diluyente (Caldo tripticasa de soya)

Tratamiento C: Diluyente (Caldo tripticasa de soya + Neutralizantes (Lecitina 0.5 +Polisorbato 20)  
+ Producto (Tyrex 27 mg/5mL jbe)

Microorganismo: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Para determinar si el producto y/o los neutralizantes tienen influencia en los resultados se evaluó la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Cochran y se plantearon las siguientes hipótesis:

Ho: Las varianzas son semejantes

H1: Las varianzas son diferentes

Si  $G_{\text{experimental}} < G_{\text{crítico}}$  Se Acepta la Ho

Luego, se halló la  $G_{\text{experimental}}$  según la siguiente fórmula:

$$G_{\text{exp}} = \frac{s^2_{\text{máxima}}}{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2}$$

Obteniéndose  $G_{\text{experimental}}$  igual 0.369386367. Luego se calculó el  $G_{\text{crítico}}$  (Según tabla de Cochran) siendo igual a 0.474 con K (número de tratamientos) igual a 3 y n (número de datos) igual a 30, por lo cual se acepta la hipótesis nula es decir, las varianzas son semejantes.

Luego se comparara los tres promedios resultantes de cada uno de los tratamientos usando para ello la prueba F planteando la siguiente hipótesis:

Ho: Prom Producto = Prom Diluyente = Prom Neutralizante  
Ha: Al menos una es diferente

SI  $F_{\text{exp}} < F_{\text{crítico}}$  Se Acepta la Ho.

Y se obtuvieron los siguientes resultados:

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	30	67.36533425	2.245511142	0.000963867
Columna 2	30	67.58705257	2.252901752	0.00098278
Columna 3	30	67.41582396	2.247194132	0.001140262



## ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.000900305	2	0.000450153	0.437478864	0.64707463	3.101291668
Dentro de los grupos	0.089520374	87	0.00102897			
Total	0.09042068	89				

Se obtuvo un F crítico igual a 3.101291668 y un F experimental igual a 0.437478864 por lo cual se acepta la  $H_0$ , es decir el promedio del recuento ocasionado por el producto, diluyente y neutralizante son semejantes.

## LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se comprobó que el método propuesto logra detectar y cuantificar una cantidad mínima de microorganismos. Para las 5 cepas de prueba se realizaron 6 repeticiones y se obtuvieron resultados igual o menor a 5 ufc/placa tanto las enfrentadas con producto (**Tabla XXI**) o sin producto (**Tabla XXII**), y se obtuvo para *Staphylococcus aureus* un porcentaje de recuperación del 100%, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 un 75%, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 un 100%, *Candida albicans* ATCC 10231 un 80% y *Aspergillus niger* ATCC 16404 un 100% respecto al control, hallando cantidades mayores al 70% comparado con el número de microorganismos recuperados de sus respectivos controles (**Tabla XXIII**).

**Tabla XXI.** Recuento mínimo obtenido de las cinco cepas de prueba enfrentadas con producto

MICROORGANISMOS	PLACA 1 (ufc)	PLACA 2 (ufc)	PLACA 3 (ufc)	PLACA 4 (ufc)	PLACA 5 (ufc)	PLACA 6 (ufc)	PROMEDIO	DESVEST	DSR
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	5	6	5	4	5	5	5	0.632	0.126
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3	3	3	4	2	2	3	0.753	0.266
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	3	2	2	2	3	3	3	0.548	0.219
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	5	4	4	4	4	4	4	0.408	0.098
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	4	3	3	4	2	4	3	0.816	0.245

**Tabla XXII.** Recuento mínimo obtenido de las cinco cepas de prueba enfrentadas sin producto

MICROORGANISMOS	PLACA 1 (ufc)	PLACA 2 (ufc)	PLACA 3 (ufc)	PLACA 4 (ufc)	PLACA 5 (ufc)	PLACA 6 (ufc)	PROMEDIO	DESVEST	DSR
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	5	4	4	5	5	5	5	0.516	0.111
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	3	4	4	4	3	3	4	0.548	0.156
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	3	3	2	3	3	3	3	0.408	0.144
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	5	5	4	5	4	5	5	0.516	0.111
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	3	3	3	4	3	3	3	0.408	0.129

**Tabla XXIII.** Porcentaje de recuperación de las cepas de prueba

MICROORGANISMOS	% Recuperación
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	75
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	100
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	80
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	100

## REPETIBILIDAD

Para este parámetro se calificó a 3 analistas obteniéndose para cada uno una DSR menor a 0.02 como se aprecia en la **Tabla XXIV**. Se realizó 10 repeticiones y dos lecturas por placa; esto cada analista, obteniendo para el analista A un DSR igual a 0.0043114, para el analista B un DSR igual a 0.0035907 y para el analista C un DSR igual a 0.0049458 encontrándose estos resultados dentro de la especificación.

**Tabla XXIV.** Lecturas de los analistas A, B, C y sus respectivos DSR

PLACA	Lectura 1 (ufc/placa)	Lectura 2 (ufc/placa)	Promedio	Desvest	DSR	Analista
1	89	90	89.5	0.707	<b>0.0079</b>	A
2	78	78	78.0	0.000	<b>0.0000</b>	A
3	93	92	92.5	0.707	<b>0.0076</b>	A
4	174	173	173.5	0.707	<b>0.0041</b>	A
5	178	179	178.5	0.707	<b>0.0040</b>	A
6	171	171	171.0	0.000	<b>0.0000</b>	A
7	159	159	159.0	0.000	<b>0.0000</b>	A
8	185	184	184.5	0.707	<b>0.0038</b>	A
9	160	160	160.0	0.000	<b>0.0000</b>	A
10	167	166	166.5	0.707	<b>0.0042</b>	A
1	88	88	88.0	0.000	<b>0.0000</b>	B
2	78	78	78.0	0.000	<b>0.0000</b>	B
3	92	93	92.5	0.707	<b>0.0076</b>	B
4	173	173	173.0	0.000	<b>0.0000</b>	B
5	176	177	176.5	0.707	<b>0.0040</b>	B
6	171	172	171.5	0.707	<b>0.0041</b>	B
7	157	157	157.0	0.000	<b>0.0000</b>	B
8	183	183	183.0	0.000	<b>0.0000</b>	B
9	160	161	160.5	0.707	<b>0.0044</b>	B
10	167	166	166.5	0.707	<b>0.0042</b>	B
1	87	87	87.0	0.000	<b>0.0000</b>	C
2	77	76	76.5	0.707	<b>0.0092</b>	C
3	91	92	91.5	0.707	<b>0.0077</b>	C
4	171	171	171.0	0.000	<b>0.0000</b>	C
5	173	175	174.0	1.414	<b>0.0081</b>	C
6	169	169	169.0	0.000	<b>0.0000</b>	C
7	157	157	157.0	0.000	<b>0.0000</b>	C
8	185	184	184.5	0.707	<b>0.0038</b>	C
9	160	160	160.0	0.000	<b>0.0000</b>	C
10	163	164	163.5	0.707	<b>0.0043</b>	C
DSR (ANALISTA A)					<b>0.0043114</b>	
DSR (ANALISTA B)					<b>0.0035907</b>	
DSR (ANALISTA A)					<b>0.0049458</b>	

## REPRODUCIBILIDAD

Para este parámetro se evaluó a 3 analistas obteniéndose entre los tres un DSR menor a 0.02 como se aprecia en la **Tabla XXV**. Se realizó 10 lecturas de placas; esto por cada

analista, obteniendo un DSR igual a 0,0104762, encontrándose este resultado dentro de especificación.

**Tabla XXV.** Lecturas entre los analistas A, B, C y su respectivo DSR total

PLACA	Analista A	Analista B	Analista C	Promedio	Desvest	DSR
1	89	88	87	88.0	1.000	0.0114
2	78	78	77	77.7	0.577	0.0074
3	92	92	91	91.7	0.577	0.0063
4	173	173	171	172.3	1.155	0.0067
5	179	176	173	176.0	3.000	0.0170
6	171	171	169	170.3	1.155	0.0068
7	159	157	157	157.7	1.155	0.0073
8	188	183	185	185.3	2.517	0.0136
9	160	160	160	160.0	0.000	0.0000
10	168	167	163	166.0	2.646	0.0159

**DSR reproducibilidad: 0.0104762**

## ROBUSTEZ

Este parámetro se evaluó según la lectura realizada al recuento de 10 placas en tres tiempos distintos (T1:72 horas, T2:96 horas, T3:120 horas) y se calculó el porcentaje de cambio parcial del recuento en cada tiempo y se halló el logaritmo de la lectura de los mismos (**Tabla XXVI**). Luego de los datos obtenidos en logaritmos se obtuvo el porcentaje de cambio parcial de cada tiempo, en el T1 es 1.8230 % para el T2 es 1.803 % y para el T3 es 1.8303 % y entre el tiempo T1 y T2 existe un porcentaje de cambio total del 0.0073% y entre T2 y T3 no registró ningún cambio (**Tabla XXVII**). Estos resultados al ser menor al 15 % de cambio total se encuentran conformes.

**Tabla XXVI.** Recuento de placas y porcentaje de cambio parcial en tres diferentes tiempos

Muestra	Recuento T 1 (ufc/placa)	Recuento T 2 (ufc/placa)	Recuento T 3 (ufc/placa)	% Cambio Parcial	Log (ufc) T 1	Log (ufc) T 2	Log (ufc) T3
1	116	117	117	1	2.0645	2.0682	2.0682
2	121	121	121	0	2.0828	2.0828	2.0828
3	51	53	53	4	1.7076	1.7243	1.7243
4	22	23	23	5	1.3424	1.3617	1.3617
5	42	42	42	0	1.6232	1.6232	1.6232
6	62	63	63	2	1.7924	1.7993	1.7993
7	82	83	83	1	1.9138	1.9191	1.9191
8	81	83	83	2	1.9085	1.9191	1.9191
9	76	77	77	1	1.8808	1.8865	1.8865
10	82	83	83	1	1.9138	1.9191	1.9191

**Tabla XXVII.** Resultado de porcentaje de cambio parcial y total en tres diferentes tiempos.

TIEMPOS	% CAMBIO PARCIAL	LECTURA EN HORAS	% CAMBIO TOTAL	CONCLUSIÓN
T1	1.8230	72 h		
T2	1.8303	96 h	0.0073	CONFORME
T3	1.8303	120 h	0.0000	CONFORME

## TOLERANCIA

En este parámetro se evaluó el recuento obtenido en tres lotes y marcas distintas de medios de cultivo más el producto Tyrex 27 mg/5 ml jarabe usando el mismo inóculo de cada una de las cepas de prueba sugerido por la USP 32 según el medio del cultivo. Se evaluó el Caldo Tripticasa de Soya (**Tabla XXVIII**), el Agar Tripticasa de Soya (**Tabla XXIX**) y el Agar Sabouraud Glucosado (**Tabla XXX**) obteniendo un recuento similar en los tres medios evaluados no existiendo variación por cambio de lote o marca del medio.

**Tabla XXVIII.** Recuento obtenido en tres lotes del Caldo Tripticasa de Soya más producto (Tyrex 27 mg/5 ml jarabe).

	MICROORGANISMOS (ufc/mL)				
LOTE	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC: 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC: 16404
VM046959/MERCK	76	44	57	31	38
9042242/DIFCO	78	43	56	31	41
9006/CRITERION	79	45	58	37	38

**Tabla XXIX.** Recuento obtenido en tres lotes del Agar Tripticasa de Soya + producto (Tyrex 27 mg/5 ml jarabe)

	MICROORGANISMOS (ufc/mL)				
LOTE	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC: 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC: 16404
08255/CRITERIO	76	44	57	31	38
09023/CRITERIO	78	43	56	31	41
VM025558/MERCK	79	45	58	37	38

**Tabla XXX.** Recuento obtenido en tres lotes del Agar Sabouraud Glucosado más producto (Tyrex 27 mg/5 ml jarabe)

	MICROORGANISMOS (ufc/mL)	
LOTE	<i>Candida albicans</i> ATCC: 10231	<i>Aspergillus niger</i> ATCC: 16404
09107/CRITERIO	31	38
08326/CRITERIO	31	41
08106/CRITERIO	37	38

## LINEALIDAD

En este parámetro se evaluó el recuento obtenido de las cinco diluciones inoculadas en el placebo más producto (

**Tabla XXXI**) y en el placebo Sin producto (**Tabla XXXII. Recuento obtenido de las cinco cepas de prueba en cinco diluciones distintas sin producto.**), obtenidos hallando el logaritmo del recuento y el coeficiente de relación ( $R^2$ ), el mismo que debe ser mayor a 0.95. Para *S. aureus* se halló  $R^2$  para la prueba con producto siendo igual a 0.9605 y el  $R^2$  para la prueba sin producto siendo igual a 0.9757, para *P. aeruginosa* se obtuvo para la prueba con producto  $R^2$  igual a 0.9634 y el  $R^2$  para la prueba sin producto igual a 0.9575, para *B. subtilis* se obtuvo para la prueba con producto  $R^2$  igual a 0.9823 y el  $R^2$  para la prueba sin producto igual a 0.9825, para *C. albicans* se obtuvo para la prueba con producto  $R^2$  igual a 0.9580 y el  $R^2$  para la prueba sin producto igual a 0.9716, para *A. niger* se obtuvo para la prueba con producto  $R^2$  igual a 0.9868 y el  $R^2$  para la prueba sin producto igual a 0.9811 (**Tabla XXXIII**) .Se encontraron los datos dentro de lo especificado comprobando así, que

los resultados son proporcionales a la concentración de microorganismos presentes en una muestra dentro de un intervalo dado.

**Tabla XXXI.** Recuento obtenido de las cinco cepas de prueba en cinco diluciones distintas con producto.

Staphylococcus aureus ATCC 6538										
N° Ensayos	Diluciones (Prueba con producto)									
	10 <sup>-5</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-6</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-7</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-8</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-9</sup> (ufc/placa)	Log
1	1064	3.0269	129	2.1106	15	1.1761	0	0	0	0
2	1080	3.0334	148	2.1703	14	1.1461	1	0	0	0
3	1024	3.0103	116	2.0645	12	1.0792	2	0.3010	1	0
4	1032	3.0137	124	2.0934	18	1.2553	1	0	0	0
5	1200	3.0792	122	2.0864	16	1.2041	2	0.3010	0	0
Promedio	1080	3.0327	134	2.1050	17	1.1722	2	0.1204	0	0
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027										
N°	Diluciones (Prueba con producto)									





Ensayos	$10^{-5}$ (ufc/placa)	Log	$10^{-6}$ (ufc/placa)	Log	$10^{-7}$ (ufc/placa)	Log	$10^{-8}$ (ufc/placa)	Log	$10^{-9}$ (ufc/placa)	Log
1	116	2.0645	30	1.4771	6	0.7782	1	0	0	0

***Staphylococcus aureus* ATCC 6538**

2	81	1.9085	32	1.5051	6	0.7782	0	0	0	0
3	85	1.9294	32	1.5051	5	0.6990	0	0	0	0
4	67	1.8261	27	1.4314	8	0.9031	0	0	0	0
5	98	1.9912	33	1.5185	6	0.7782	0	0	0	0
Promedio	89	1.9439	31	1.4875	6	0.7873	0	0	0	0

***Tabla XXXII.*** Recuento obtenido de las cinco cepas de prueba en cinco diluciones distintas sin producto.

N° Ensayos	Diluciones (Prueba sin producto)									
	10 <sup>-5</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-6</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-7</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-8</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-9</sup> (ufc/placa)	Log
1	1232	3.0906	137	2.1367	16	1.2041	2	0.3010	1	0
2	1232	3.0906	138	2.1399	18	1.2553	2	0.3010	0	0
3	1168	3.0674	124	2.0934	14	1.1461	2	0.3010	1	0
4	1296	3.1126	149	2.1732	19	1.2788	2	0.3010	0	0
5	1232	3.0906	121	2.0828	18	1.2553	2	0.3010	0	0
Promedio	1232	3.0904	134	2.1252	17	1.2279	2	0.3010	0	0
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027										
N° Ensayos	Diluciones (Prueba sin producto)									
	10 <sup>-4</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-5</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-6</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-7</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-8</sup> (ufc/placa)	Log
1	70	1.8451	11	1.0414	3	0.4771	0	0	0	0
2	69	1.8388	12	1.0792	1	0.0000	2	0.3010	0	0
3	59	1.7709	9	0.9542	2	0.3010	0	0	0	0
4	63	1.7993	12	1.0792	3	0.4771	0	0	0	0
5	68	1.8325	10	1.0000	2	0.3010	0	0	0	0
Promedio	66	1.8173	11	1.0308	2	0.3113	0	0.0602	0	0
Bacillus subtilis ATCC 6633										
N° Ensayos	Diluciones (Prueba sin producto)									
	10 <sup>-3</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-4</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-5</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-6</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-7</sup> (ufc/placa)	Log
1	MNPC	-	450	2.6532	31	1.4914	8	0.9031	0	0
2	MNPC	-.	390	2.5911	31	1.4914	8	0.9031	0	0
3	MNPC	-	472	2.6739	29	1.4624	9	0.9542	1	0
4	MNPC	-	368	2.5658	30	1.4771	7	0.8451	2	0.301
5	MNPC	-	430	2.6335	27	1.4314	8	0.9031	0	0
Promedio	MNPC	-	422	2.6235	30	1.4707	8	0.9017	1	0.060
Candida albicans ATCC 10231										
N°	Diluciones (Prueba sin producto)									

Ensayos	10 <sup>-4</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-5</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-6</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-7</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-8</sup> (ufc/placa)	Log
1	880	2.9445	178	2.2504	22	1.3424	2	0.3010	1	0
2	928	2.9675	123	2.0899	12	1.0792	2	0.3010	0	0
3	866	2.9375	139	2.1430	11	1.0414	2	0.3010	1	0
4	910	2.9590	149	2.1732	9	0.9542	2	0.3010	0	0
5	865	2.9370	133	2.1239	10	1.0000	2	0.3010	0	0
Promedio	890	2.9491	144	2.1561	13	1.0834	2	0.3010	0	0
<b><i>Aspergillus niger ATCC 16404</i></b>										
N° Ensayos	Diluciones (Prueba sin producto)									
	10 <sup>-5</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-6</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-7</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-8</sup> (ufc/placa)	Log	10 <sup>-9</sup> (ufc/placa)	Log
1	66	1.8195	33	1.5185	5	0.6990	0	0	0	0
2	67	1.8261	23	1.3617	4	0.6021	0	0	0	0
3	88	1.9445	41	1.6128	6	0.7782	1	0	0	0
4	87	1.9395	30	1.4771	4	0.6021	0	0	0	0
5	75	1.8751	35	1.5441	7	0.8451	0	0	0	0
Promedio	77	1.8809	32	1.5028	5	0.7053	0	0	0	0
MICROORGANISMOS				R <sup>2</sup> con producto			R <sup>2</sup> sin producto			

**Tabla XXXIII.** Coeficiente de correlación (r<sup>2</sup>) obtenido en las cinco diluciones de prueba con o sin producto.

<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	0.9605	0.9757
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	0.9634	0.9575
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.9823	0.9825
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0.9580	0.9575
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	0.9868	0.9716

## PRUEBAS CUALITATIVAS AUSENCIA –PRESENCIA

Se obtuvieron resultados conformes para los diferentes parámetros cualitativos.

## ROBUSTEZ

Se determinó este parámetro evaluando en tres tiempos el crecimiento de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* en el Caldo Tripticasa de Soya, siendo el T1: 17 horas, T2: 24 horas y T3: 48 horas. Se obtuvieron resultados conformes en los dos lotes utilizados del producto Tyrex 27 mg/5 mL jarabe, hallando en los tres tiempos evaluados la presencia de *Escherichia coli* en el Caldo Mac Conkey y en el Agar Mac Conkey (**Tabla XXXIV**), y la presencia de *Salmonella enterica* en el Caldo Rappaport Vasilliaris y en el Agar Mac XLD demostrando que el método no es afectado en variaciones de tiempos pequeños (**Tabla XXXV**).

**Tabla XXXIV.** Resultados obtenidos durante tres diferentes tiempos de crecimiento de *Escherichia coli*



## TOLERANCIA

Se determinó este parámetro utilizando 3 lotes distintos del Caldo Mac Conkey y 3 lotes distintos de Agar Mac Conkey para la detección de *Escherichia coli* (**Tabla XXXVI**) y se utilizó 2 lotes distintos de Caldo Rappaport Vassiliadis y 2 dos lotes distintos de Agar XLD para la detección de *Salmonella enterica*. (**Tabla XXXVII**). Se obtuvieron resultados conformes demostrando que el método resiste cambios tales como la diferencia de lotes de un medio.

**Tabla XXXVI.** Resultados obtenidos del crecimiento de *Escherichia coli* en tres lotes de medios distintos

<i>Escherichia coli</i> ATCC ATCC 8739			
CALDO MAC CONKEY		AGAR MAC CONKEY	
8210W/CRITERION	+	8158/CRITERION	+
7324W/CRITERION	+	8100W/CRITERION	+
6233011/DIFCO	+	6167236/DIFCO	+

**Tabla XXXVII.** Resultados obtenidos del crecimiento de *Salmonella enterica* en dos lotes de medios distintos

<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028			
CALDO RAPPAPORT VASSILIADIS		AGAR XLD	
VM943900/MERCK	+	VM907987/MERCK	+
VM214100/Merck	+	VM683587/MERCK	+

## LÍMITE DE DETECCIÓN

Se obtuvo resultados conformes para este parámetro, apreciando crecimiento característico de *Escherichia coli* en el Caldo Trypticase de Soya, Caldo Mac Conkey y Agar Mac Conkey y crecimiento característico de *Salmonella enterica* en el Caldo Trypticase de Soya, Caldo Rappaport Vassiliadis y Agar XLD para las tres réplicas realizadas para cada lote del producto trabajado, asimismo se realizaron los controles positivos y negativos obteniendo resultados esperados (**Tabla XXXVIII**, **Tabla XXXIX**).

**Tabla XXXVIII.** Resultados obtenidos en la prueba de límite de detección para *Escherichia coli*

<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 8739</b>						
<i>Muestra: Tyrex 27mg/5 mL jarabe</i>	<i>Lote: 00510859</i>			<i>Lote:00611799</i>		
<b>MEDIOS DE PRUEBA</b>	<b>CALDO TRIPTICASA DE SOYA</b>	<b>CALDO MAC CONKEY</b>	<b>AGAR MAC CONKEY</b>	<b>CALDO TRIPTICASA DE SOYA</b>	<b>CALDO MAC CONKEY</b>	<b>AGAR MAC CONKEY</b>
<b>ENFRENTAMIENTO (Inóculo + Muestra + Medio) Réplica 1</b>	+	+	+	+	+	+
<b>ENFRENTAMIENTO (Inóculo + Muestra + Medio) Réplica 2</b>	+	+	+	+	+	+
<b>ENFRENTAMIENTO (Inóculo + Muestra + Medio) Réplica 3</b>	+	+	+	+	+	+
<b>CONTROLES NEGATIVOS (Medios)</b>	-	-	-	-	-	-
<b>CONTROLES POSITIVOS (Inóculo + Medio)</b>	+	+	+	+	+	+



**Tabla XXXIX.** Resultados obtenidos en la prueba de límite de detección para *Salmonella enterica*

<b><i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028</b>						
<i>Muestra: Tyrex 27mg/5 mL jarabe</i>	<i>Lote: 00510859</i>			<i>Lote:00611799</i>		
MEDIOS DE PRUEBA	CALDO TRIPTICASA DE SOYA	CALDO RAPPAPORT VASSILIADIS	AGAR XLD	CALDO TRIPTICASA DE SOYA	CALDO RAPPAPORT VASSILIADIS	AGAR XLD
<b>ENFRENTAMIENTO (Inóculo + Muestra + Medio) Réplica 1</b>	+	+	+	+	+	+
<b>ENFRENTAMIENTO (Inóculo + Muestra + Medio) Réplica 2</b>	+	+	+	+	+	+
<b>ENFRENTAMIENTO (Inóculo + Muestra + Medio) Réplica 3</b>	+	+	+	+	+	+
<b>CONTROLES NEGATIVOS (Medios)</b>	-	-	-	-	-	-
<b>CONTROLES POSITIVOS (Inóculo + Medio)</b>	+	+	+	+	+	+

## ESPECIFICIDAD

Se determinó resultados conformes en la evaluación de especificidad del método dando crecimiento positivo sólo en el Caldo Mac Conkey y en el Agar Mac Conkey cuando se inocula la cepa *Escherichia coli* y no en el Agar Baird Parker y el Agar Manitol Salado, los mismos que presenta crecimiento positivo si se inocula la cepa de *S.aureus*. Estos resultados se repitieron para los dos lotes de producto utilizados (**Tabla XL**). Asimismo, se demostró especificidad dando crecimiento positivo sólo en el Caldo Rappaport Vassiliadis y en el Agar XLD cuando se inocula la cepa *Salmonella enterica* y no en el Agar Baird Parker y el Agar Manitol Salado, los mismos que presenta crecimiento positivo si se inocula la cepa de *S.aureus*. Estos resultados se repitieron para los dos lotes de producto utilizados (**Tabla XLI**).

**Tabla XL.** Resultados de especificidad obtenidos en la detección de *Escherichia coli* en medios selectivos

<b>Producto:</b> <b>Tyrex</b> <b>27mg/5mL jbe.</b>  <b>Lote:00510859</b>	<i>Escherichiacoli</i> ATCC8739				<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
	control positivo		control negativo		control positivo		control negativo	
	Caldo Mac Conkey	Agar Mac Conkey	Agar Baird Parker	Agar Manitol Salado	Agar Baird Parker	Agar Manitol Salado	Caldo Mac Conkey	Agar Mac Conkey
Réplica 1	+	+	-	-	+	+	-	-
Réplica 2	+	+	-	-	+	+	-	-
Réplica 3	+	+	-	-	+	+	-	-
<b>Producto:</b> <b>Tyrex</b> <b>27mg/5mL jbe.</b>  <b>Lote:00611799</b>	<i>Escherichiacoli</i> ATCC8739				<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
	control positivo		control negativo		control positivo		control negativo	
	Caldo Mac Conkey	Agar Mac Conkey	Agar Baird Parker	Agar Manitol Salado	Agar Baird Parker	Agar Manitol salado	Caldo Mac Conkey	Agar Mac Conkey
Réplica 1	+	+	-	-	+	+	-	-
Réplica 2	+	+	-	-	+	+	-	-
Réplica 3	+	+	-	-	+	+	-	-

**Tabla XLI.** Resultados de especificidad obtenidos en la detección de *Salmonella enterica* en medios selectivos

<b>Producto:</b> <b>Tyrex</b> <b>27mg/5mL jbe.</b>  <b>Lote:00510859</b>	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028				<i>Staphylococcu saureus</i> ATCC 6538			
	control positivo		control negativo		control positivo		control negativo	
	Caldo Rappaport Vassiliadis	Agar XLD	Agar Baird Parker	Agar Manitol Salado	Agar Baird Parker	Agar Manitol Salado	Caldo Rappaport Vassiliadis	Agar XLD
Réplica 1	+	+	-	-	+	+	-	-
Réplica 2	+	+	-	-	+	+	-	-
Réplica 3	+	+	-	-	+	+	-	-
<b>Producto:</b> <b>Tyrex</b> <b>27mg/5mL jbe.</b>  <b>Lote:00611799</b>	<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028				<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538			
	control positivo		control negativo		control positivo		control negativo	
	Caldo Rappaport Vassiliadis	Agar XLD	Agar Baird Parker	Agar Manitol Salado	Agar Baird Parker	Agar Manitol Salado	Caldo Rappaport Vassiliadis	Agar XLD
Réplica 1	+	+	-	-	+	+	-	-
Réplica 2	+	+	-	-	+	+	-	-
Réplica 3	+	+	-	-	+	+	-	-

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los ensayos muestran que todas las cepas de prueba en la dilución seleccionada tienen un recuento en promedio dentro del rango de 20 a 200 ufc/placa el mismo exigido por la USP 34. Cabe mencionar que los datos obtenidos para la cepa *Bacillus subtilis* ATCC 6633 si bien están dentro del rango se encuentran cercanos al límite inferior, debido quizás, a la manera en que se realizó la colecta en placa, ya que se presentó una mayor dificultad al colectarlo pues adquirió una consistencia en grumos al añadir la solución salina, no permitiendo una colecta total de la cepa. Sin embargo, Galeno (2007) reporta una similar recuperación de este microorganismo utilizando otra metodología de obtención.

Las pruebas realizadas a los medios de cultivo utilizados para los ensayos resultaron conformes tanto en la prueba de control positivo como en la promoción de crecimiento, en este último parámetro se obtuvo un porcentaje de recuperación mayor al 50 % en el Agar Tripticasa de Soya y en el Agar Sabouraud Glucosado demostrando que los medios involucrados en la prueba se encontraron en óptimas condiciones. Sin embargo, se puede llegar a incluir el método ecométrico que permite ver la productividad de los medios como se aprecia en el trabajo de Padilla (2007), debido a que pueden existir pequeños errores en la preparación de medios y así obtener resultados con mayor certeza

La dilución realizada al producto Tyrex 27mg/5 mL jarabe (1/10) permitió la adecuada recuperación microbiana en las diferentes pruebas de ensayo comprobando que este producto requiere la mínima dilución para la detección de los posibles microorganismos presentes.

En los ensayos de los parámetros cuantitativos se obtuvieron resultados esperados para los diferentes ensayos realizados especificados a continuación:

Para el estudio del parámetro de especificidad se evaluó el diluyente así como el producto a usar en el estudio. Se comprobó que los neutralizantes (lecitina y polisorbato 20) no interfieren en la recuperación del microorganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, el mismo que se tomó como microorganismo de referencia. Asimismo se comprobó que el

producto en estudio no interfiere en la recuperación del microorganismo evaluado obteniéndose un recuento en promedio semejante al obtenido con el diluyente sin producto. Para ambos casos, ninguno de los neutralizantes ni el producto interfiere en los ensayos de identificación propuestos en la monografía. En los estudios realizados por Ortiz (2008), también se observa que el diluyente utilizado, el cual es el mismo que se utilizó no interfiere en ninguno de los microorganismos de prueba, sin embargo se recomienda realizar la misma prueba con los microorganismos de prueba faltantes.

En el caso del parámetro de límite de detección y cuantificación se comprobó que el método logró hallar en promedio la mínima cantidad cuantificable y detectable de 5 ufc/placa para el caso de los cinco microorganismos de prueba con un porcentaje de recuperación mayor al 70%. En los estudios realizados por Ortiz (2008) solo se logró evaluar 3 microorganismos los mismos que lograron detectar la mínima cantidad pero no se evidencia una comparación sin influencia del producto (control) que permita conocer el porcentaje de recuperación.

Para evaluar el parámetro de repetibilidad y reproducibilidad del método se obtuvo la desviación estándar relativa a partir del recuento de diez placas obtenido de tres analistas observando un DSR menor de 0.02 de cada uno de ellos obteniendo una calificación de analista óptima encontrando repetitividad en sus datos y se obtuvo un DSR menor al 0.02 entre ellos comprobando que los datos son reproducibles.

Asimismo se evaluaron lecturas a lo largo de tres tiempos los cuales son planteados en la técnica como tiempo de incubación (3 a 5 días) y se obtuvieron lecturas con porcentajes de cambios menores a 15 % para los tres tiempos comprobando la robustez del método.

El método evaluado resiste cambios de lotes y marcas de medios de cultivo no observándose cambios significativos en la recuperación microbiana evaluándose así la tolerancia del método. Este parámetro se deberá seguir evaluándose a través del tiempo.

El cumplimiento de la linealidad del sistema en el intervalo de concentraciones estudiado para los diferentes microorganismos de prueba debido a que se obtuvo para todas ellas un coeficiente de correlación mayor a 0.95 tanto usando el diluyente más producto como el

diluyente solo, comprobando que el producto no ejerce influencia significativa en la recuperación de los microorganismos de prueba y demostrando la proporcionalidad existente entre la cantidad de analito y la respuesta medida por el método microbiológico. En el estudio de Ortiz (2008), se logra obtener un coeficiente de correlación similar en *Staphylococcus aureus* y mayor en *Pseudomonas aeruginosa*, y se añade en su estudio la linealidad del microorganismo *Escherichia coli* mas no incluyen a *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*

En los ensayos cualitativos se obtuvieron resultados conformes en la detección del microorganismo *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella entérica* ATCC 14028 en los diferentes ensayos evaluados como también se aprecia en el estudio de Ortiz (2008).

Además el método puede sufrir modificaciones en tiempos pequeños, lotes y marca de los medios de cultivo específicos para la detección de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella entérica* ATCC 14028 como se aprecia en el estudio de robustez y tolerancia.

El método logra detectar un mínimo de inóculo (5uf/mL) de *Escherichia coli* ATCC 8739 apreciándose crecimiento característico en el caldo Mac Conkey y Agar Mac Conkey dentro del margen de tiempo establecido por el método. Asimismo, logra detectar un mínimo de inóculo de *Salmonella entérica* ATCC 14028 obteniéndose crecimiento característico en el caldo Rappaport Vassiliadis y en el Agar XLD dentro del margen de tiempo establecido por el método

Asimismo se comprobó que el método es específico para la detección de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella entérica* ATCC 14028. no afectando el producto evaluado en la detección de estos microorganismos observando crecimiento característico en los medios selectivos utilizados y por el contrario al usar *Staphylococcus aureus* no se observó crecimiento alguno en estos medios comprobándose que el método permite detectar en forma confiable los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Salmonella entérica* ATCC 14028.

## CONCLUSIONES

1. Las diluciones de trabajo establecidas para las cepas de prueba podrán ser utilizadas en diferentes pruebas o para validar otro tipo de producto farmacéutico.
2. Los medios evaluados Agar Tripticasa de Soya, Agar Sabouraud Glucosado, Caldo Tripticasa de Soya Agar Mac Conkey, Caldo Mac Conkey. Caldo Rappaport Vassiliadis y Agar XLD son idóneos para la promoción de crecimiento de los microorganismos de prueba.
3. La dilución adecuada para el análisis del producto Tyrex 27 mg/5 mL jarabe es 1/10 y el diluyente preparado con Caldo Tripticasa de Soya más lecitina al 0,5% mas polisorbato 20 al 4% no afecta la recuperación de los microorganismos que pudieran estar presentes en él.
4. El método propuesto queda validado para el análisis microbiológico del producto farmacéutico Tyrex 27 mg/5 mL de acuerdo con los resultados conformes de todos los parámetros recomendados por la USP 34.

## **RECOMENDACIONES**

Se recomienda:

- 1.- Evaluar cualitativamente el producto Tyrex jarabe con microorganismos específicos distintos a los usados en este trabajo, de modo que podamos verificar el rango de detección de la metodología propuesta.
- 2.- Hacer una re-validación periódica para determinar la necesidad de posibles cambios en el procedimiento planteado.
- 3.- Validar esta técnica para otros tipos de medicamentos líquidos para determinar las variaciones existentes, y poder finalmente estandarizarlo.

## BIBLIOGRAFÍA

- AHMED A. ABDELAZIZ; TAREK E. ELBANNA; NOHA M.GAMALELDEEN  
Validated microbiological and HPLC methods for the determination of moxifloxacin in pharmaceutical preparations and human plasma Brazilian Journal of Microbiology.2012. ISSN 1517-8382: 1291-1301 pp 1292
- CLONTZ, L. Microbial Limit and Bioburden Tests-Validation Approaches de los medicamentos. 2009. RTCA 11.03.39:06.
- COMISIÓN PARA LA PROMOCIÓN DE EXPORTACIONES. Estudio de oferta y demanda del sector Farmacéutico peruano y plantas medicinales. Prompex-Latinpharma. 2003. pp. 1-2.
- CURREN, R. *et al.* The role of prevalidation in the development validation and acceptance of alternative methods. ATLA. 1995.
- DIGEMID. Teofilina.  
<http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/Teofilina.pdf>
- DIRECCIÓN GENERAL DE MEDICAMENTOS, INSUMOS Y DROGAS. Manual de Buenas Prácticas de Manufactura de insumos de uso médico-quirúrgicos u odontológicos estériles y productos sanitarios estériles. Cap. V art.51º- art 52º. 2000.
- EASTER, M. Rapid microbiological methods in the pharmaceutical industry. Interpharm/CRC Press. 2005. pp.142-147.
- GALENO.N. Validación de la retención microbiana en los filtros de acetato y nitrato de celulosa empleados de la técnica de filtración por membrana para la prueba de esterilidad. Trabajo de grado para optar el título de Microbiólogo Industrial Universidad Javeriana. Bogota D.C.2007
- INSTITUTO NACIONAL DE DEFENSA DE LA COMPETENCIA Y DE PROTECCION DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL, Requisitos generales para la



competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. NTP-ISO/IEC 17025.2006. 2º Edición.

- INSTITUTO NACIONAL DE ESTADISTICA E INFORMATICA. Boletín estadístico de salud.2009.Ver 2.
- L&S CONSULTORES. Validación de métodos de ensayo. Nota Técnica. Abril 2003. pp. 1-7.
- LEY GENERAL DE SALUD (1997)  
.http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/LEYN26842.pdf
- ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN. Guía para la validación de métodos de ensayo.OAA. 2003. Ver. 1. pp. 1-16.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD. La salud en las Américas. Revista de OPS. 1998. Vol. 1. pp 312-316.
- ORTIZ, D. Validación e Implementación de una metodología para el análisis microbiológico de un producto líquido preservado elaborado en una industria farmacéutica. Tesis para optar el título de Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad de Javeriana. Bogotá-Colombia. 2008.
- PADILLA, J. Validación secundaria del método de recuento en placa en superficie de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* en muestras de alimentos en un laboratorio de referencia Trabajo de grado para optar el título de Microbiólogo Industrial Universidad Javeriana. Bogotá D.C.2007
- SARTORY DP. VALIDATION. Verification and comparison: Adopting new methods in water microbiology. Water SA. 2005. Disponible en: URL: <http://www.wrc.org.za>
- SILVA, G. Validación del método de valoración de Glimeperide presentación comprimido de 4mg por el método de cromatógrafo líquido de alta performance HPLC. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 2004.
- SUTTON, S. Validation of alternative microbiology methods for product testing. Pharmaceutical Technology. 2005. pp. 118-122.
- TOBAR, F. Economía de los medicamentos genéricos en América Latina. Revista Panamericana de Salud Pública. 2008. pp. 59–67.

- UNITED STATES PHARMACOPEA CONVENTION. United States Pharmacopeia XXXII/National Formulary XXVII. Capítulo 61, 1227. 2003.